



Universidade de Aveiro
Ano 2018

Departamento de Biologia

**ANA PAULA
PEREIRA DE
SOUSA**

**Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos do
paracetamol e piritionato de zinco em
Daphnia magna e *Daphnia longispina*.**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2018

**ANA PAULA
PEREIRA DE
SOUSA**

**Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos do
paracetamol e piritionato de zinco em
Daphnia magna e *Daphnia longispina*.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes, Equiparado a Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM).

Dedico este trabalho a Léo e Maria Clara.

o júri

presidente

Doutora Susana Patrícia Mendes Loureiro
Professora Auxiliar C/ Agregação do Departamento de
Biologia da Universidade de Aveiro e do Centro de Estudos
do Ambiente e do Mar (CESAM).

arguente

Doutora Isabel Maria Cunha Antunes Lopes
Equiparada a Investigadora Principal do Departamento de
Biologia da Universidade de Aveiro e do Centro de Estudos
do Ambiente e do Mar (CESAM).

orientador

Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes
Equiparado a Investigador Auxiliar do Departamento de
Biologia da Universidade de Aveiro e do Centro de Estudos
do Ambiente e do Mar (CESAM).

agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por sempre abrir as portas do meu caminho e enchê-la de “anjos”.

À Universidade de Aveiro pela oportunidade e acolhimento. Ao meu orientador, Doutor Bruno Nunes, por sua competência e prestimosa disponibilidade. Aos demais docentes do Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados. À professora Isabel Lopes por gentilmente ter cedido os animais para o enriquecimento do meu trabalho. À Prefeitura de São Luís, pelo apoio financeiro e incentivo para esta capacitação.

À Vitor Castro, por sua receptividade e acolhida em terras lusitanas. Aos meus colegas do DBio, pelos momentos de convivência e amizade. A todos que direta ou indiretamente colaboraram com o trabalho laboratorial, especialmente ao Abel por sua inestimável disponibilidade e competência. À Anabela e Gilberto pelas conversas, cafés, almoços, ajudas e amizade. Aos alunos do professor Bruno Nunes pela companhia, espírito de equipe e momentos de descontração. À Karen, por toda a sua amizade, carinho e disponibilidade.

À minha mãe, simplesmente por tudo...

Ao meu pai, “in memoriam”, por me ensinar a amar e respeitar a natureza.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo real sentido de família. Aos amigos do Brasil, pelo incentivo e torcida. À Enila e Márcio por sonhar os sonhos com a gente. À Plínio Fontenelle, Anderson Menezes e Karla Paixão, pela amizade de vidas...

À minha filha Maria Clara, pela compreensão que uma menina de 8 anos pode ter...

E por fim ao meu esposo Leonardo Botta, principal responsável e incentivador para realização deste trabalho. Pelo apoio e incentivo, companheirismo e amor.

palavras-chave

Biocidas, Fármacos, EC₅₀, Biomarcadores, Estresse Oxidativo, Neurotoxicidade, Comportamento, Reprodução.

resumo

As substâncias farmacêuticas utilizadas na terapêutica humana e animal são classificadas como contaminantes emergentes, juntamente com produtos de higiene pessoal e cosméticos, e atingem o meio aquático por diferentes vias. Os danos associados aos fármacos em compartimentos ambientais se manifestam em baixas concentrações, podendo afetar indivíduos, populações e comunidades. Neste estudo, duas espécies de microcrustáceos de água doce do gênero *Daphnia* (*D. magna* e *D. longispina*) foram expostas a dois compostos de uso farmacêutico, nomeadamente o antipirético analgésico paracetamol e o antifúngico piritionato de zinco, de forma aguda e crônica. Os objetivos foram registrar a toxicidade desses fármacos considerando parâmetros como mortalidade (cálculo de EC₅₀), reprodução, efeito comportamental (natação), *stress* oxidativo (catalase e GSTs), e neurotoxicidade (AChE) após exposições a concentrações subletais de ambos os fármacos. Alterações no comportamento natatório e efeitos oxidativos (evidenciado pela alteração das actividades das enzimas catalase e GSTs) foram observados após exposição ao paracetamol para as duas espécies testadas. A exposição ao piritionato de zinco demonstrou ter efeitos neurotóxicos e oxidativos, com alteração no comportamento natatório. Não houve alteração na reprodução dos indivíduos expostos. Os dados obtidos demonstram que níveis ecologicamente relevantes de fármacos, após formas de exposição realistas, podem alterar parâmetros críticos em duas espécies distintas de microcrustáceos de água doce, embora com padrões de toxicidade nem sempre coincidentes. É possível assim concluir que a avaliação de diferentes níveis de resposta e a integração de dados ecotoxicológicos para espécies de organismos-testes diferentes, é uma estratégia que permite avaliar de forma mais concreta os efeitos subtis e nem sempre coincidentes que os fármacos podem causar no ambiente.

keywords

Biocides, Drugs, EC₅₀, Biomarkers, Oxidative Stress, Neurotoxicity, Behavior, Reproduction.

abstract

Pharmaceutical substances used in human and animal therapy are classified as emerging contaminants, together with personal care products and cosmetics, and reach the aquatic environment through different routes. Damage associated with drugs in environmental compartments is manifested in low concentrations and can affect individuals, populations and communities. In this study, two species of freshwater microcrustaceans of the genus *Daphnia* (*D. magna* and *D. longispina*) were exposed to two compounds of pharmaceutical use, namely the antipyretic analgesic paracetamol and the antifungal zinc pyrithione, acute and chronic. The objectives were to record the toxicity of these drugs considering parameters such as mortality (EC₅₀ calculation) and reproduction; behavioral effect (swimming), oxidative stress (catalase and GSTs), and neurotoxicity (AChE) after exposure to sublethal concentrations of both drugs. Changes in swimming behavior and oxidative effects (evidenced by altered activities of catalase and GSTs enzymes) were observed after exposure to paracetamol for the two species tested. Exposure to zinc pyrithione has been shown to have neurotoxic and oxidative effects, with changes in swimming behavior. There was no change in the reproduction of exposed individuals. The data obtained demonstrate that ecologically relevant levels of drugs, after realistic forms of exposure, can alter critical parameters in two distinct species of freshwater microcrustaceans, although with not coincident patterns of toxicity. It is thus possible to conclude that the evaluation of distinct levels of response and the integration of ecotoxicological data into species of different test organisms is a strategy that allows to evaluate in a more concrete way the subtle and not always coincident effects that the drugs can cause in the environment.

Índice

Lista de Figuras	iv
Lista de Gráficos.....	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	viii
I. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....	1
1.1. Fármacos como contaminantes ambientais.....	1
1.2. Evolução do consumo dos fármacos e suas consequências.....	3
1.3. Fármacos no ambiente.....	5
1.4. Paracetamol como contaminante ambiental.....	8
1.5. Piritionato de zinco como contaminante ambiental.....	12
1.6. Ensaio ecotoxicológico.....	16
1.7. Organismos do género <i>Daphnia</i> como organismos teste.....	17
1.8. Características morfológicas e fisiológicas de organismos do género <i>Daphnia</i>	18
1.9. Ciclo de vida.....	20
1.10. Ecologia comportamental.....	20
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.1. Cultura dos organismos-testes.....	22
2.2. Compostos químicos e concentrações de teste.....	22
2.3. Mortalidade.....	23
2.4. Biomarcadores	23
2.4.1. Actividade da enzima Catalase (CAT).....	24
2.4.2. Actividade das isoenzimas Glutathione S-transferases (GSTs).....	24
2.4.3. Actividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	25
2.4.4. Determinação do conteúdo em proteína solúvel total.....	25
2.5. Avaliação comportamental.....	26
2.6. Reprodução.....	27
2.7. Análise estatística.....	27

III. RESULTADOS.....	28
3.1. Mortalidade.....	28
3.2. Biomarcadores.....	29
3.2.1. Catalase (CAT)	29
3.2.2. Glutathione S-transferases (GSTs)	30
3.2.3. Acetilcolinesterase (AChE)	32
3.3. Comportamento de natação.....	33
3.3.1. Paracetamol.....	34
3.3.2. Piritionato de zinco.....	35
3.4. Reprodução.....	36
 IV. DISCUSSÃO.....	 37
4.1. Mortalidade.....	37
4.1.1. Paracetamol.....	37
4.1.2. Piritionato de zinco.....	38
4.2. Biomarcadores.....	41
4.2.1. Defesa antioxidante	42
4.2.1.1. Paracetamol.....	43
4.2.1.2. Piritionato de zinco.....	46
4.2.2. Neurotoxicidade.....	47
4.2.2.1. Paracetamol.....	47
4.2.2.2. Piritionato de zinco.....	48
4.3. Alterações comportamentais.....	49
4.4. Reprodução.....	52
 V. CONCLUSÕES.....	 54
 BIBLIOGRAFIA.....	 56
Anexos	

**Anexo I. Comportamento de natação após exposição ao paracetamol -
Daphnia magna (24h)**

**Anexo II. Comportamento de natação após exposição ao paracetamol
- *Daphnia magna* (6dias)**

**Anexo III. Comportamento de natação após exposição ao paracetamol
- *Daphnia longispina* (6 dias)**

**Anexo IV. Comportamento de natação após exposição ao piritionato
de zinco - *Daphnia magna* (24h)**

**Anexo V. Comportamento de natação após exposição ao piritionato de
zinco - *Daphnia longispina* (24h)**

**Anexo VI. Comportamento de natação após exposição ao piritionato
de zinco - *Daphnia magna* (6 dias)**

**Anexo VII. Comportamento de natação após exposição ao piritionato
de zinco - *Daphnia longispina* (6 dias)**

Lista de Figuras

Figura 1. Fotos de *Daphnia magna* Straus, 1820 e *Daphnia longispina* (O.F. Müller, 1776) (Adaptado de Antunes & Castro 2017).

Figura 2. Ilustração da anatomia interna e externa de *Daphnia* sp. (Adaptado de Antunes & Castro 2017)

Figura 3. Movimentos realizados pelos organismos em exposição aos ciclos claro (A) e escuro (B). Primeira coluna refere-se ao controle e as demais aos tratamentos.

Figura 4. Actividade da catalase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao paracetamol, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p<0,05$) entre as diferentes concentrações de paracetamol e o controle negativo.

Figura 5. Actividade da catalase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao piritionato de zinco, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p<0,05$) entre as diferentes concentrações de piritionato de zinco e o controle negativo.

Figura 6. Actividade das glutathione S-transferases quantificadas em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao paracetamol, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p<0,05$) entre as diferentes concentrações de paracetamol e o controle negativo.

Figura 7. Actividade das glutathione S-transferases quantificadas em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao piritionato de zinco, U=nmol/min, n=5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p<0,05$) entre as diferentes concentrações de piritionato de zinco e o controle negativo.

Figura 8. Actividade da acetilcolinesterase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao paracetamol, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão.

Figura 9. Actividade da acetilcolinesterase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao piritionato de zinco, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p < 0,05$) entre as diferentes concentrações de piritionato de zinco e o controle negativo.

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Número total de neonatos libertados no teste de reprodução para as duas espécies de *Daphnia*.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resumo da toxicidade do paracetamol em organismos aquáticos. Dados relativos ao banco de dados U.S.E.P.A. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

Tabela 2. Resumo da toxicidade do piritionato de zinco em organismos aquáticos. Dados relativos ao banco de dados U.S.E.P.A. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

Tabela 3. Valores de EC₅₀ e respectivos intervalos de confiança (IC) de 95 %.

Tabela 4. Análise estatística do teste comportamental após exposição ao paracetamol e piritionato de zinco, com n=20 e g.l.(5, 114). Valores de F e p encontram-se inseridos de acordo como os ciclos, idade dos organismos e composto analisado.

Tabela 5. Alterações comportamentais observadas em *D. magna* e *D. longispina* após exposição ao paracetamol e piritionato de zinco, onde, TT - tempo total de natação(s), TD - distância total percorrida(mm), 300 e 900 (ciclo claro), 600 e 1200 (ciclo escuro), (↑) - aumento em relação ao controle, (↓) - diminuição em relação ao controle, e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, p<0,05) entre as diferentes concentrações de paracetamol e piritionato de zinco em relação ao controle negativo.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

AChE - Acetilcolinesterase

CAT - Catalase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CE - Contaminantes Emergentes

CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar

COX - Ciclooxygenase

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DQA - Directiva Quadro da Água

DTNB - 5,5-*dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*

ETARs - Estação de Tratamento de Águas Residuais

EU– *European Union*

EUA- Estados Unidos da América

FDA - *Food and Drug Administration*

g.l. - graus de liberdade

GPx - Glutathione Peroxidase

GSTs - Glutathione S-transferases

IC - Intervalo de Confiança

IMO - *International Maritime Organization*

LCM - Leitos Construído de Macrófitas

MEPC - *Marine Environment Protection Committee*

NAPQI - N-acetil-p-benzoquinona

OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*

PEC - *Predicted environmental concentration*

PNEC - *Predicted no effect concentration*

RNA - Ácido Ribonucleico

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances*

TBT- Tributyltin

TD - Distância Total

TPT – Triphenyltin

TT - Tempo Total

US EPA – *United States Environmental Protection Agency*

I. INTRODUÇÃO

1.1. Fármacos como contaminantes ambientais

Os produtos farmacêuticos têm sido considerados importantes poluentes devido à sua crescente detecção em amostras ambientais (Ankley et al. 2007; Pugajeva et al. 2017), por serem biologicamente ativos e potencialmente causar danos a organismos, aos ecossistemas e inclusivamente à saúde humana (Elorriaga et al. 2013). Fármacos são substâncias com estrutura química definida que possuem propriedades terapêuticas capazes de modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos, ou permitir a prevenção e o diagnóstico dos mesmos (ANVISA 2010). São amplamente utilizados na terapêutica humana e veterinária pois devido às suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, associadas à constante libertação no ambiente, fazem com que sejam classificados como contaminantes emergentes (CE), juntamente com produtos de higiene pessoal e cosméticos (Carvalho et al. 2009). Seu uso frequente está relacionado com o crescimento e envelhecimento das sociedades (Verlicchi et al. 2012) que, devido aos avanços tecnológicos e investimentos em pesquisa científica, tem desenvolvido cada vez mais a cobertura sanitária e de cuidados de saúde, facilitando o acesso a produtos que contribuem para qualidade de vida da população; tal facto conduz ao aumento do seu consumo (Beek et al. 2016), o que ocasiona descargas relativamente contínuas dessas substâncias e seus metabolitos no ambiente, que em última análise, atingem o ecossistema aquático (Beek et al. 2016; Pugajeva et al. 2017).

Os resíduos farmacêuticos podem chegar ao ambiente por diferentes vias, sendo a mais comum através dos efluentes das estações de tratamentos de águas residuais (ETARs), visto que depois de serem consumidos, os medicamentos são excretados, na sua forma original ou metabolizada, pelas fezes e urina (Carvalho et al. 2009; Elorriaga et al. 2013). Estes contaminantes exibem propriedades diversas e complexas, que justificam o exercício potencial de efeitos adversos quando inseridos no ambiente aquático (Salibián 2013). Devido à complexidade e multiplicidade das suas estruturas químicas, são de difícil remoção pelos métodos tradicionais como filtração, remoção físico-químicas e biológicas (Sousa 2015; Marin-Morales et al. 2016). Para além disto, técnicas analíticas que permitam

identificar e quantificar essas substâncias em baixas concentrações ($\mu\text{g/L}$ e ng/l) em matrizes ambientais complexas, tais como recursos hídricos, solo, sedimentos, lodo biológico e efluente de estações de tratamento constituem ainda desafio para os pesquisadores (Marin-Morales et al. 2016). Estes aspectos que condicionam o eficaz tratamento dos resíduos de medicamentos constituem-se como limitações naturais das estações de tratamento, pois estas foram concebidas para eliminar essencialmente a matéria orgânica e organismos patogénicos (Carvalho et al. 2009; Nunes 2011; Sousa 2015) refletindo a necessidade de meios mais eficazes e economicamente viáveis para tratamento desses resíduos.

Apesar desta ineficácia generalizada por parte das ETARs, há alguns processos de tratamento terciários como membranas, oxidação catalítica, ozonização, radiação ultravioleta, reatores de membrana e adsorção por carvão ativado, que parecem ser moderadamente eficazes para tratar fármacos nas águas residuais (Fent et al. 2006). Algumas alternativas vêm sendo testadas, como filtros à base de argila, leitos construídos de macrófitas (LCM), resíduos da agroindústria ou outro subproduto industrial para tratamento de xenobióticos, incluindo fármacos (Miranda 2014). Em Portugal, devido aos elevados custos destes métodos, sua utilização somente é obrigatória no tratamento de descargas em áreas sensíveis e/ou sujeitas à eutrofização, segundo o Decreto-Lei 152/97, alterado e revisto pelos Decretos-Lei nº 172/2001, nº 149/2004 e 198/2008. A Directiva Quadro da Água (DQA) - Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu estabelece um quadro para proteção das águas de superfície, águas de transição e águas costeiras, juntamente com a Directiva 2006/118/CE relativa à proteção das águas subterrâneas e da Directiva 2008/105/CE referente à Lista de Substâncias Prioritárias. No entanto, todo este enquadramento legislativo não abrange a monitorização de produtos farmacêuticos, mesmo que estes tenham sido documentados há mais de 20 anos (Verlicchi et al. 2012).

A deficiência ou ausência dos processos de tratamentos de esgotos é uma realidade em alguns países, onde o esgoto bruto é lançado na natureza sem nenhum tratamento (Melo et al. 2009). Associado a isso, o uso generalizado de medicamentos e a inexistência de um sistema ou infraestrutura para o seu descarte adequado, fazem com que estes resíduos cheguem à natureza de forma contínua

e variada (Elorriaga et al. 2013). Os medicamentos ainda são descartados em lixo comum e esgotos, contaminando solo e água e ocasionando risco direto à saúde relacionado à sua reutilização intencional ou acidental (Carvalho et al. 2009). Em países emergentes na fabricação farmacêutica, como os países asiáticos (Bangladesh, China, Índia e Paquistão), na maioria de suas unidades, os resíduos industriais são descartados na rede doméstica de esgoto, sem nenhum tratamento (Rehman et al. 2015). Estas águas residuais não tratadas são utilizadas como fonte de irrigação devido a sua disponibilidade e baixo custo para os agricultores, representando elevado risco de contaminação ambiental com produtos farmacêuticos residuais (Rehman et al. 2015).

As instituições regulamentares da área do medicamento estão cientes da necessidade de adotar princípios e práticas que assegurem a não contaminação dos recursos aquáticos por fármacos e seus resíduos. O FDA (*Food and Drug Administration*), agência federal dos Estados Unidos responsável pela promoção da saúde pública através do controle e fiscalização de produtos alimentares e medicamentos, emitiu orientações sobre a destino final adequado dos medicamentos, no sentido de evitar descartar medicamentos na sanita ou na pia; no entanto na mesma resolução refere que algumas substâncias devem ser descartadas nesses locais, devido aos elevados riscos à saúde, para evitar ingestão acidental (FDA, 2017). A União Europeia (EU), possui legislação que estabelece um quadro para gestão e tratamento de resíduos nos diferentes países constituintes (Directiva 2008/98/CE). Estabelece ainda os requisitos essenciais para a gestão dos resíduos de modo que não haja impactos negativos no ambiente e saúde humana. Define ainda, segundo a hierarquia dos resíduos, que os custos de eliminação de resíduos sejam suportados pelo seu detentor atual, pelos anteriores detentores dos resíduos ou pelos produtores do produto que lhe deu origem (CE, 2008).

1.2. Evolução do consumo dos fármacos e suas consequências.

Em meados do século XIX, o arsenal terapêutico disponível consistia em poucos fármacos, e apesar de muitos serem utilizados desde a antiguidade, a maior

parte não possuíam estruturas e mecanismos de ação conhecidos e não eram considerados os seus perfis de segurança (Melo et al. 2006). A partir da década de 1950, ocorreu um grande aumento no número de fármacos patenteados, e a indústria farmacêutica investiu maciçamente em propaganda, aumentando substancialmente a sua utilização (Nascimento 2005). A falta de requisito de segurança na legislação possibilitava a introdução desses produtos no mercado sem testes de toxicidade, ocasionando prejuízos à saúde ou mesmo morte de indivíduos (Castro 2000; Melo et al. 2006). Os medicamentos passaram então a ser vistos não só como agentes terapêuticos, mas também como elementos que, mesmo em doses usuais, podem causar efeitos nocivos. Surge então a farmacovigilância com objetivo de identificar e avaliar efeitos agudos ou crônicos, relacionados ao uso do medicamento pela população (Castro 2000). No entanto, esta vigilância não se aplica aos seus efeitos nocivos para o ambiente. A preocupação com os danos causados pela exposição ambiental aos fármacos surgiu somente por volta da década de 70, inicialmente em países desenvolvidos, onde grandes quantidades de produtos farmacêuticos começaram a ser produzidos e consumidos. A partir da década de 90, o aprimoramento de tecnologias para a detecção de substâncias, propiciaram pesquisas mais eficientes e consistentes, resultando em trabalhos científicos que apontaram a presença de fármacos em amostras ambientais (efluentes de esgoto, águas superficiais ou subterrâneas) em várias partes do mundo e os riscos associados a esses resíduos (Melo et al. 2009; Gracianni & Ferreira 2014).

A presença dessas substâncias no ambiente pode causar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres representando risco para o ecossistema e para o homem (Pugajeva et al. 2017). Os danos associados à presença dos fármacos em compartimentos ambientais podem se manifestar em baixas concentrações, na ordem de ng/l ou µg/L, e podem ocorrer em vários níveis de organização biológica (célula, órgão, indivíduo, populações e ecossistemas) (Bila & Dezotti 2003; Gaffney et al. 2014). Diversos são os efeitos nocivos encontrados na literatura que decorrem da exposição aos fármacos, como alterações na expressão génica (genotoxicidade) e alterações imunológicas (imunotoxicidade), alterações do sistema endócrino (redução da produção embrionária, alterações na

motilidade espermática, feminilização de machos e masculinização de fêmeas), modificação no comportamento (na performance natatória e conduta de escape de predadores, preferência claro/escuro), associados a esses químicos (Salibián 2013; Gaffney et al. 2014; Marin-Morales et al. 2016). Adicionalmente, existem estudos suficientes que demonstram a ocorrência de desordens de natureza bioquímica como *stress* oxidativo, peroxidação lipídica e neurotoxicidade também induzidos por fármacos (Nunes et al. 2006; Antunes et al. 2013; Jasinska et al. 2015; Oliveira et al. 2015; Mezzelani et al. 2016).

Estes efeitos decorrem do fato dos fármacos possuírem actividade biológica e serem ativos e persistentes, ou seja, são sintetizados e produzidos para alterar funções biológicas e manter suas propriedades químicas o tempo necessário para assegurar o exercício do propósito terapêutico (Nunes 2011). Outras características dos fármacos são, elevada potência farmacológica e biodisponibilidade (para que pequenas quantidades consigam exercer seus efeitos), moderada lipofilia (para que sejam absorvidos pelas membranas biológicas e cumpram seus efeitos terapêuticos), potencial de bioacumulação, e resistência à biotransformação (para que não sejam excretados antes de exercer a sua ação farmacológica). Estes factores justificam a sua potencial relevância toxicológica. O risco ambiental é apresentado pela sua contínua libertação para o meio que, mesmo em pequenas concentrações, são suficientes para induzir alterações e danos (Bila & Dezotti 2003; Nunes 2010; Nunes 2011). Estudos demonstram que os fármacos produzem efeitos adversos nos organismos aquáticos expostos, e apesar de existirem pesquisas sobre seus efeitos agudos, há poucos estudos referentes à exposição a longo prazo. Testes toxicológicos têm sido realizados para tentar compreender os danos causados por essas substâncias, mas é difícil extrapolar resultados para escala ambiental devido à complexidade desse meio, tais como condições bióticas e abióticas, interações (sinergismo, adição, por exemplo) entre outras (Costa et al. 2008; Carvalho et al. 2009; Sousa 2015).

1.3. Fármacos encontrados no ambiente

Devido à contribuição das diversas fontes anteriormente mencionadas, os fármacos hoje encontram-se amplamente disseminados por diversos compartimentos ambientais, nomeadamente o aquático, mas também o terrestre, embora em menor extensão. Diversos estudos (Bila & Dezotti 2003; Fent et al. 2006; Elorriaga et al. 2013; Gaffney et al. 2014; Beek et al. 2016; Balakrishna et al. 2017) apontam a detecção de fármacos em esgoto bruto (não tratado), efluentes de estações de tratamento, águas superficiais, subterrâneas e água para consumo (potável), sedimentos e até mesmo em solos sujeitos à aplicação de lodo de esgoto. Os níveis de concentração dos resíduos farmacêuticos encontrados no ambiente variam habitualmente de ng/l a µg/L (Pugajeva et al. 2017), e estão relacionados ao seu padrão de consumo, persistência destes no meio, pela eficiência de remoção nas ETARs e pela sazonalidade (Carvalho et al. 2009).

Em levantamento feito por Melo et al. (2009), diversas classes terapêuticas foram detectadas em concentrações na faixa de ng/l a µg/L em várias partes do Mundo, como por exemplo antibióticos em esgoto bruto na Espanha (Carballa et al. 2004), Itália (Castiglioni et al. 2006) e Suécia (Bendz et al. 2005); em efluentes de ETARs na Alemanha (Hirsch et al. 1999), Canadá (Gagné et al. 2006), Espanha (Carballa et al. 2004), França, Grécia (Andreozzi et al. 2003), Itália (Carballa et al. 2004), Suécia (Bendz et al. 2005) e Suíça (Golet et al. 2001); em águas superficiais nos EUA (Kolpin et al. 2002; Stackelberg et al. 2004) e Itália (Calamari et al. 2003) e em águas subterrâneas na Alemanha (Sacher et al. 2001). Compostos β-bloqueadores foram já encontrados em esgoto bruto na Itália (Castiglioni et al. 2006) e Suécia (Bendz et al. 2005); efluentes de ETARs na Alemanha, França, Grécia (Andreozzi et al. 2003), Itália (Castiglioni et al. 2006) e Suécia (Bendz et al. 2005); e em águas superficiais na Alemanha (Ternes 1998) e Itália (Calamari et al. 2003). Fármacos com actividade antilipídica foram já reportados em esgoto bruto no Brasil (Stumpf et al. 1999), Finlândia (Lindqvist et al. 2005) e Suécia (Bendz et al. 2005); em efluentes de ETARs na Alemanha (Ternes 1998), Canadá (Gagné et al. 2006), França, Itália e Grécia (Andreozzi et al. 2003); em águas superficiais na Alemanha (Ternes 1998) e EUA (Kolpin et al. 2002). Drogas com propriedades anti-inflamatórias foram também já identificadas em esgoto bruto no Brasil (Stumpf et al. 1999; Ghiselli 2006), Espanha (Santos et al. 2005), Finlândia (Lindqvist et al.

2005) e Suécia (Bendz et al. 2005); em efluentes de ETARs na Alemanha (Ternes 1998), Brasil (Stumpf et al. 1999), Canadá (Gagné et al. 2006), Espanha (Carballa et al. 2004), Finlândia (Lindqvist et al. 2005), França, Grécia, Itália (Andreozzi et al. 2003) e Suécia (Bendz et al. 2005); e em águas superficiais na Alemanha (Ternes 1998), Brasil (Stumpf et al. 1999; Ghiselli 2006) e EUA (Kolpin et al. 2002). Fármacos com acção hormonal foram monitorizadas em esgoto bruto no Brasil (Ghiselli 2006; Ternes et al. 1999); em efluentes de ETARs no Brasil (Ghiselli 2006), Alemanha e Canadá (Ternes et al. 1999); em águas superficiais no Brasil (Ghiselli 2006) e EUA (Kolpin et al. 2002); e em água potável no Brasil (Ghiselli 2006). Alguns anticonvulsivantes foram quantificados em esgoto bruto na Espanha (Santos et al. 2005) e Suécia (Bendz et al. 2005); em efluente de ETARs na Alemanha (Ternes 1998), Canadá (Gagné et al. 2006), Espanha (Santos et al. 2005), França, Grécia, Itália (Andreozzi et al. 2003) e Suécia (Bendz et al. 2005), e em águas superficiais (Alemanha).

O levantamento bibliográfico realizado por Beek et al. (2016), revela a detecção dessas substâncias em ambientes aquáticos de todos os continentes, e em diferentes matrizes ambientais, sendo que 631 substâncias farmacêuticas se encontravam acima do limite de detecção ($\mu\text{g/l}$) dos métodos analíticos empregados nas publicações. Segundo a revisão de literatura conduzida por Donnachie et al. (2016), drogas como diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, carbamazepina, naproxeno, atenolol, etinilestradiol, aspirina, fluoxetina, propranolol, metoprolol e sulfametoxazol são os fármacos de maior preocupação, considerando dados ambientais e ecotoxicológicos baseados em dados de prescrição, concentrações ambientais, concentração ambiental prevista/concentração prevista sem efeito (PEC/PNEC), persistência/bioacumulação/(eco)toxicidade (Donnachie et al. 2016).

Dentre as classes terapêuticas ambientalmente relevantes encontram-se os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), pois são amplamente utilizados devido às suas propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. São ácidos fracos e agem como inibidores não seletivos das isoformas da ciclooxigenase, COX-1 e COX-2, enzima envolvida na síntese de ácidos graxos bioativos, como prostaglandinas e leucotrienos, derivados do ácido araquidônico, que são

associados a funções homeostáticas e à inflamação (Funk 2001; Hayashi et al. 2008; Santos et al. 2010). Ensaios realizados com pimpão (*Carassius auratus*), exposto a lipossacarídeos bacterianos foi observada elevada produção de prostaglandinas, que retornou ao seu estado basal após introdução de um inibidor seletivo da COX-2, sugerindo que a estimulação pode ser devida a uma enzima indutível equivalente à COX-2 de mamíferos (Zou et al. 1999). Em invertebrados a síntese de prostaglandinas foi relatado em *Mytilus* (mexilhão), *Homarus* (lagosta), *Lumbricus* (minhoca) e *Cyanea* (água-viva), sendo estes organismos suscetíveis à inibição das suas formas de COX por AINES (Rowley 2005).

1.4. Paracetamol como contaminante ambiental

De entre os fármacos com propriedades analgésicas e antipiréticas, o paracetamol (N-acetil-p-aminofenol, também conhecido por acetaminofeno) é um fármaco amplamente utilizado em medicina humana (Nunes et al. 2014). É um fraco inibidor da ciclooxigenase, com propriedades analgésicas e antipiréticas, mas sem actividade anti-inflamatória significativa (Santos et al. 2010). O surgimento de níveis elevados de paracetamol em águas residuais deve-se à sua elevada metabolização e excreção após toma por pacientes humanos. O paracetamol causa preocupação ambiental, pois apesar de ser em grande parte eliminado pelos processos convencionais utilizados nas ETARS como tratamentos primários (eliminação de sólidos) e secundários (tratamento biológico e clarificação para desinfecção de organismos patogénicos), uma pequena fração é detectada no meio aquático (ng/l ou µg/l) (Gómez et al. 2007). As concentrações de paracetamol no ambiente aquático estão relacionadas à eficiência das estações de tratamentos de águas residuais, que podem remover até 99% do fármaco, mas apesar dessa eficiência, concentrações variáveis são encontradas no ambiente (Gómez et al. 2007; Gracia-Lor et al. 2012). Adicionalmente, devido à sua constante introdução no ecossistema, é considerado um poluente pseudo-persistente. Concentrações variadas desse fármaco foram encontradas em diferentes compartimentos aquáticos, como na Espanha - Rio Onyar (0,243 µg/L), efluente de ETAR (0,338 µg/l) (Gros et al. 2012); França - efluentes de águas residuais (11,3 µg/l), água

potável (0,211 µg/l), águas subterrâneas (5,3 ng/l), poços de abastecimento de água potável (8,3 - 211ng/l) (Rabiet et al. 2006); Inglaterra - Rio Tyne (69,5 µg/l)(Roberts & Thomas 2006). Em monitoramento realizado na Espanha, concentrações de paracetamol em águas residuais que chegavam a ETAR, variavam de 29 a 246µg/l, e após tratamentos primário e secundário com clarificação, diminuíram para 4,3µg/l no seu efluente (Gómez et al. 2007). Estudo realizado em França na bacia hidrográfica do Rio Herault, o paracetamol foi detectado em águas residuais (1,081-11,30µg/l), águas superficiais (0,0106-0,0723µg/l), e água de torneira (0,21µg/l); com maior concentração para águas residuais da enseada rochosa Cortiou (200µg/l) provenientes de ETAR onde não havia tratamento secundário (Togola & Budzinski 2008). Em Portugal, o paracetamol foi detectado no Rio Arade na região sul de Portugal, em concentrações entre 19-88ng/l (Gonzalez-Rey et al. 2015), e em sete rios do norte. Nesses rios, paracetamol e seus metabolitos (p-aminofenol e paracetamol-glicuronídeo) foram detectados, com concentrações de 0,25µg/l para o paracetamol, 3,47 µg/l para o metabolito paracetamol-glicuronídeo, e 1,63 µg/l para o p-aminofenol (Santos et al. 2013).

Em humanos, apesar de seguro em doses terapêuticas, doses excessivas de paracetamol podem causar lesões hepáticas, sendo relatados na literatura desde 1960 (McGill et al. 2012). O consumo excessivo de paracetamol tem sido a causa mais comum de insuficiência hepática nos Estados Unidos da América (EUA) e Reino Unido (Larson et al. 2005). Estudos conduzidos por Larson et al. (2005) estimaram que pelo menos 250 casos de insuficiência hepática estavam relacionados com o paracetamol, resultando em 73 mortes por anos nos EUA. Estudos em ratos demonstram que o paracetamol pode causar alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias do fígado (Bajt et al. 2006). Em camundongos, foi observado que altas doses de paracetamol podem causar *stress* oxidativo, disfunção mitocondrial, fragmentação do DNA e morte celular (McGill et al. 2012). Em mamíferos, paracetamol, em doses terapêuticas, é conjugado com cofatores (sulfato e ácido glucurônico) formando metabolitos mais solúveis em água que são eliminados através da urina e um pouco através da bile (Bessemers & Vermeulen 2001). No entanto, a toxicidade deste composto deriva da sua

metabolização, que conduz quando em doses elevadas, a uma bioativação por intermédio de enzimas do citocromo P450 (nomeadamente, a isoenzima CYP2E1) formando um metabolito altamente reativo e eletrofílico denominado N-acetil-p-benzoquinoemina (NAPQI), que na presença de glutathione é conjugado e excretado devido ao aumento da sua hidrossolubilidade (Dahlin et al. 1984). Em doses excessivas de paracetamol, pode haver uma exaustão dos cofatores ácido glucurónico e sulfato, fomentando que o excesso de paracetamol seja metabolizado pelo citocromo P450; ao ser produzida uma quantidade acrescida de NAPQI, ocorre posteriormente a exaustão também da glutathione, que pode ocasionar um acúmulo de NAPQI e dos seus efeitos tóxicos (Hinson & Al 2003). Esta molécula pode reagir e exercer efeitos tóxicos, como modificações covalentes de grupos tiol em proteínas celulares, danos no DNA e RNA, oxidação de lipídios da membrana, resultando em necrose e morte celular (Hinson & Al 2003; Brandão et al. 2011). A dependência de cofatores ou disponibilidade de glutathione influenciam os níveis de segurança do paracetamol.

Na maior parte dos organismos, o metabolismo oxidativo é mediado pelas isoenzimas do citocromo P450 (Snyder 2000). Considerando que os citocromos são hemoproteínas encontradas na membrana interna de mitocôndrias e retículo endoplasmático, cloroplastos de células eucarióticas e que participam de reações na membrana citoplasmática de células procarióticas (Costa et al., 2004), é esperado que mecanismos de ação semelhantes possam existir em organismos não visados que estejam ambientalmente expostos a essa substância. Todavia, estas isoenzimas não se encontram bem desenvolvidas em invertebrados aquáticos, contribuindo para diferenças significativas nos resultados dos testes de exposição a xenobióticos (Snyder 2000).

Estudos com várias espécies de organismos vertebrados e invertebrados foram realizados para se observar a toxicidade e os efeitos do paracetamol em organismos não-alvo. Nunes et al. (2014), avaliou a toxicidade aguda para diferentes espécies expostas ao paracetamol, considerando a concentração do paracetamol capaz de causar mortalidade ou imobilidade a 50% dos organismos (EC_{50}), que foi calculada para cladóceros - *Daphnia magna* (4,7 mg/l) e *Daphnia longispina* (65,9mg/l), bactérias - *Vibrio fischeri* (92,2mg/l), microalgas -

Pseudokirchneriella subcapitata (317,4mg/l), cianobactérias - *Cylindrospermopsis raciborskii* (192,9mg/l), plantas aquáticas - *Lemna minor* (429,9mg/l) e *Lemna gibba* (>1000mg/l)(Nunes et al. 2014). Dados sobre toxicidade do paracetamol para vários organismos aquáticos, em termos de EC₅₀, estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo da toxicidade (mortalidade) do paracetamol em organismos aquáticos. Dados relativos ao banco de dados U.S.E.P.A. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

Espécies	Parâmetro	Concentração (mg/l)	Referência
<i>Artemia salina</i>	LC50 (24 h)	577	Webb, 2001. Pharm. Environ. 175-201
<i>Brachionus calyciflorus</i>	LC50 (24 h)	5306	Webb, 2001. Pharm. Environ. 175-201
<i>Brachydanio rerio</i>	LC50 (48 h)	378	Henschel et al., 1997. Regul. Toxicol. Pharm. 25, 220-225
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	EC50 (48 h)	192,9	Nunes et al. 2014. Ecotoxicol. Environ. 107 (2014) 178–188
<i>Daphnia longispina</i>	EC50 (48 h)	65,9	Nunes et al. 2014. Ecotoxicol. Environ. 107 (2014) 178–186
<i>Daphnia magna</i>	LC50 (24 h)	224	Du et al. 2016. Bull Environ Contam Toxicol (2016) 97:84-90
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (48 h)	40	Du et al. 2016. Bull Environ Contam Toxicol (2016) 97:84-90
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (48 h)	50	Henschel et al., 1997. Regul. Toxicol. Pharm. 25, 220-225
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (24 h)	13	Webb, 2001. Pharm. Environ. 175-201
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (24 h)	55,5	Calleja et al., 1994. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 69-78
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (24 h)	293	Webb, 2001. Pharm. Environ. 175-201
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (48h)	11,85	Kim et al. 2012. Chemosphere89(1): 10-18
<i>Daphnia magna</i>	LC50 (24h)	53,87	Kim et al. 2012. Chemosphere89(1): 10-18
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (48 h)	4,7	Nunes et al. 2014. Ecotoxicol. Environ. 107 (2014) 178–185
<i>Daphnia magna</i>	EC50 (96 h)	26,6	Kim et al., 2007. Environ. Int. 33:370-375
<i>Dugesia japonica</i>	LC50 (24h)	858,6	Li 2013. Toxicol. Environ. Chem.95(7): 1157-1170
<i>Dugesia japonica</i>	LC50 (96h)	150,8	Li 2013. Toxicol. Environ. Chem.95(7): 1157-1170
<i>Dugesia japonica</i>	EC50 (48h)	371,5	Li 2013. Toxicol. Environ. Chem.95(7): 1157-1170
<i>Lemna gibba</i>	EC50 (48 h)	>1000	Nunes et al. 2014. Ecotoxicol. Environ. 107 (2014) 178–189
<i>Lemna minor</i>	EC50 (48 h)	429,9	Nunes et al. 2014. Ecotoxicol. Environ. 107 (2014) 178–187
<i>Moina macrocopa</i>	LC50 (24h)	109,5	Kim et al. 2012. Chemosphere89(1): 10-18
<i>Moina macrocopa</i>	EC50 (48h)	56,34	Kim et al. 2012. Chemosphere89(1): 10-18
<i>Oryzias latipes</i>	LC50 (48 h)	4160	Kim et al., 2007. Environ. Int. 33, 370-375
<i>Oryzias latipes</i>	LC50 (96 h)	4160	Kim et al., 2007. Environ. Int. 33, 275-370
<i>Oryzias latipes</i>	LC50 (96h)	>160	Kim et al. 2007. Environ. Int.33(3): 370-375
<i>Oryzias latipes</i>	EC50 (48h)	>160	Kim et al. 2007. Environ. Int.33(3): 370-375
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 (48 h)	317,4	Nunes et al. 2014. Ecotoxicol. Environ. 107 (2014) 178–185
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	EC50 (72 h)	134	Henschel et al., 1997. Regul. Toxicol. Pharm. 25, 220-225
<i>Streptocephalus proboscideus</i>	EC50 (24 h)	9,2	Calleja et al., 1994. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 69-78
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	EC50 (48 h)	112	Henschel et al., 1997. Regul. Toxicol. Pharm. 25, 220-225
<i>Vibrio fischeri</i>	EC50 (15 min)	567,5	Kim et al., 2007. Environ. Int. 33, 275-370
<i>Vibrio fischeri</i>	EC50 (30 min)	650	Henschel et al., 1997. Regul. Toxicol. Pharm. 25, 220-225
<i>Vibrio fischeri</i>	EC50 (48 h)	92,2	Nunes et al. 2014. Ecotoxicol. Environ. 107 (2014) 178–185

Bioacumulação e efeitos celulares foram avaliados em moluscos *Mytilus galloprovincialis*, expostos a 25µg/l de paracetamol por 14 dias. Bioacumulação não foi detectada, no entanto, outros efeitos contribuíram para que o paracetamol fosse considerado como risco moderado para essa espécie, dentre eles alterações imunológicas com redução da estabilidade da membrana lisossomal, efeitos neurotóxicos com aumento na actividade da acetilcolinesterase presente na hemolinfa, efeitos genotóxicos com aumento da frequência de micronúcleos,

alterações histológicas com acúmulo de lipofuscina na glândula digestiva e redução de lipídios neutros (Mezzelani et al. 2016). Amêijoas da espécie *Ruditapes philippinarum* foram submetidos a períodos de exposição e recuperação ao paracetamol onde foram analisados parâmetros toxicológicos através de biomarcadores, observando-se alterações no sistema de defesa antioxidantes (actividade de enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase (Nunes et al. 2017); efeitos tóxicos oxidativos também foram observados aquando da exposição de *Ruditapes philippinarum* ao paracetamol em diferentes salinidades (Correia et al. 2016), e de *Corbicula fluminea*, com diminuição da actividade da glutathione-S-transferase (GSTs) e da glutathione reductase (GRed) (Brandão et al. 2011). Stress oxidativo e neurotoxicidade foram reportados também em *Daphnia magna* exposta a paracetamol, com inibição significativa das actividades da acetilcolinesterase (AChE) e glutathione peroxidase (GPx) (Oliveira et al. 2015). A enguia europeia *Anguilla anguilla* foi exposta a diferentes concentrações de paracetamol (5 – 3125µg/l) em ensaio agudos de 96h, onde foram observados efeitos como inibição da acetilcolinesterase, alterações na GSTs (aumento no fígado e inibição nas brânquias), aumento da peroxidação lipídica -TBARs nas brânquias (Nunes et al. 2015). Efeitos como alterações morfológicas e histológicas foram observados em rim de peixe-zebra, *Danio rerio* expostos a concentrações ambientais (0,5-10µg/l) de paracetamol (Galus et al. 2013). Em truta, *Oncorhynchus mykiss*, após exposição a paracetamol foram observadas alterações histológicas em rim e fígado, com aumento da taxa de filtração glomerular e aumento nas concentrações de eletrólitos, alterações branquiais com capacidade reduzida para absorver oxigênio (Choi et al. 2018).

1.5. Piritionato de zinco como contaminante ambiental

O piritionato de zinco (1-Hydroxipiridina-2-tiona, sal de zinco) é um biocida organometálico, que exerce actividade bactericida, fungicida e algicida. É usado como ingrediente ativo em produtos médicos e higiênicos (como champôs anticaspa e sabonetes) (Schwartz et al. 2011), e como antiincrustante em tintas antivegetativas que impedem a formação de biofilme em superfícies em contato

com o meio aquático (Turley et al. 2009; Ohji & Harino 2017), nomeadamente utilizada em embarcações ou estruturas aquáticas e submersas.

Os biocidas anti-incrustantes estão entre os compostos mais importantes presentes no meio ambiente, pois são usados para prevenir a colonização espontânea de organismos em estruturas imersas na água, como cascos de navios, bóias, plataformas petrolíferas, equipamento de aquaculturas, dentre outros (Konstantinou & Albanis 2004; Almeida et al. 2007; Soroldoni et al. 2017). Uma grande diversidade de organismos marinhos, desde bactérias, protozoários e diatomáceas (microincrustação), até organismos mais complexos como moluscos, esponjas, cracas e algas adultas (macroincrustação), aderem à superfície dessas estruturas causando impactos ambientais, como introdução de novas espécies nos ecossistemas, e econômicos, como o aumento do atrito em embarcações que diminuem a sua velocidade de navegação, aumentando o consumo de combustível (consequentemente maior emissão de poluentes na atmosfera como o dióxido de carbono e enxofre) (Almeida et al. 2007; Martins & Vargas 2013). Para diminuir a proliferação desses organismos, compostos com natureza biocida (anti-incrustantes) são adicionados às tintas. Por volta de 1950, compostos organometálicos (com estanho, arsénio, mercúrio e outros) foram utilizados para a fabricação de tintas antivegetativas. Tintas à base de tributilestanho (*tributyltin*, TBT) e trifenilestanho (*triphenyltin*, TPT), foram mundialmente consumidas (cerca de 50.000 toneladas por ano), devido a sua grande capacidade biocida, e por serem degradados facilmente por fotólise e pela acção de microrganismos (Martins & Vargas 2013). Cerca de 10 anos após o início da sua utilização, surgiram os primeiros relatos dos efeitos nocivos em organismos não-alvo, o que alertou o Comitê de Proteção do Ambiente Marinho (MEPC - *Marine Environment Protection Committee*) e a Organização Marítima Internacional (IMO), a tomarem medidas para diminuir os impactos causados por esses compostos (Cuevas et al. 2011). O dano mais importante associado aos compostos organoestânicos é o “imposex” que se refere à imposição, ou superposição das características sexuais masculinas, com desenvolvimento de pênis e canal deferente em gastrópodes fêmeas acarretando deficiência na reprodução e consequentemente o declínio das espécies (Barroso et al. 2000; Barroso et al. 2002). Estes efeitos ocorrem pela exposição no ambiente a

concentrações sub-letais dos compostos e se dá devido a disrupção endócrina e foram observados em gastrópodes como nas espécies *Nassarius reticulatus*, *Nassarius nitidus*, *Nucella lapillus*, *Hydrobia ulvae* e *Littorina littorea* (Barroso et al. 2000; Laranjeiro et al. 2015). Os efeitos nocivos causados pelo TBT, desencadearam uma série de regulamentações com o intuito de diminuir e evitar os impactos causados por biocidas. Na União Europeia (UE), em 2003 foram proibidos usos de organoestânicos em embarcações (Regulamento 782/2003) e em 2008 (Convenção AFS), a IMO implementou uma proibição global destes compostos. A regulamentação internacional (EUR/EGU n° 528/2012) foi emitida para garantir que os novos biocidas não tenham tantos impactos negativos ao ambiente (Anastasiou et al. 2016), para tal, muitos fatores devem ser levados em consideração como a quantidade utilizada, efeitos do seus resíduos, produtos de degradação, e da sua acumulação na água e sedimentos (Jung et al. 2017).

Desde a proibição do uso do TBT, outros biocidas surgem como alternativa aos organoestânicos, como compostos orgânicos não metálicos como: Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine, Clorotalonil, Tiram, entre outros, e compostos metálicos (orgânicos e inorgânicos) como Piritionato de Zinco e Cobre, Ziram, Óxido Cuproso e Naftenato de Cobre (Castro et al. 2011; Ohji & Harino 2017). No entanto, nenhuma destas alternativas se revelou simultaneamente eficaz e protetora do meio ambiente.

Piritionato de zinco pode entrar no ambiente através das estações de tratamentos de águas residuais ou durante processos de reparo, limpeza ou pintura de embarcações, em estaleiros e docas, pela libertação de partículas das tintas antivegetativas que podem ser transportados dissolvidos na água e se depositar nos sedimentos (Soroldoni et al. 2017). Sedimentos contendo partículas de tintas antivegetativas podem sofrer ressuspensão e lixiviar compostos como Cu e Zn mantendo-os disponíveis a organismos aquáticos (Jung et al. 2017). O piritionato de zinco pode sofrer transquelação ao interagir com íons metálicos livres. Muitas formulações de tintas antivegetativas possuem cobre na sua composição na forma de CuO, que pode ser libertado na água na forma de Cu^{2+} . Este pode reagir com o piritionato de zinco e se transformar em piritionato de cobre, ambos podem ser potencialmente perigosos para organismos aquáticos (Ohji & Harino 2017).

Trabalhos para avaliar a toxicidade aguda do piritionato de zinco em organismos aquáticos em termos de mortalidade foram realizados por diversos autores. Um resumo dos valores de EC₅₀ encontrados na literatura para vários organismos aquáticos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo da toxicidade (mortalidade) do piritionato de zinco em organismos aquáticos. Dados relativos ao banco de dados U.S.E.P.A. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

Espécies	Parâmetro	Concentração (µg/l)	Referências
<i>Acropora tumida</i>	LC50 (24h)	180	Bao et al. 2011. Mar. Pollut. Bull.62(5): 1147-1151
<i>Artemia salina</i>	LC50 (24h)	3170	Koutsafitis & Aoyama 2007. Sci. Total Environ.387(1-3): 166-174
<i>Artemia sp.</i>	LC50 (48h)	3147	Jung et al. 2017. Mar. Pollut. Bull.:8 p.
<i>Balanus amphitrite</i>	LC50 (24h)	210	Bao et al. 2011. Mar. Pollut. Bull.62(5): 1147-1151
<i>Chydorus sphaericus</i>	LC50 (48h)	197	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Chydorus sphaericus</i>	LC50 (24h)	407	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Cypretta seurati</i>	LC50 (48h)	524	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Cypretta seurati</i>	LC50 (24h)	2415	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Cypretta seurati</i>	LC50 (24h)	627	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Cypretta seurati</i>	LC50 (48h)	337	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Daphnia magna</i>	LC50 (48h)	98	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Daphnia magna</i>	LC50 (24h)	145	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Daphnia magna</i>	LC50 (48h)	75	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Daphnia magna</i>	LC50 (24h)	106	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Elasmopus rapax</i>	LC50 (48h)	>100	Bao et al. 2008. Mar. Pollut. Bull.157 (91-93): 616-623
<i>Elasmopus rapax</i>	LC50 (24h)	>100	Bao et al. 2008. Mar. Pollut. Bull.57(6-12): 616-623
<i>Elasmopus rapax</i>	LC50 (96h)	29	Bao et al. 2014. Mar. Pollut. Bull.57(6-12): 616-623
<i>Heptacarpus futilirostris</i>	LC50 (96h)	120	Mochida et al. 2006. Environ. Toxicol. Chem.25(11): 3058-3064
<i>Hydroides elegans</i>	LC50 (48h)	4,4	Bao et al. 2008. Mar. Pollut. Bull.157 (91-93): 616-623
<i>Ilyocypris dentifera</i>	LC50 (48h)	137	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Ilyocypris dentifera</i>	LC50 (48h)	291	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Ilyocypris dentifera</i>	LC50 (24h)	>4000	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Ilyocypris dentifera</i>	LC50 (24h)	1872	Sánchez-Bayo & Goka 2006. Aquat. Toxicol.78(3): 262-271
<i>Oryzias melastigma</i>	LC50 (96h)	43	Bao et al. 2011. Mar. Pollut. Bull.62(5): 1147-1151
<i>Pagrus major</i>	LC50 (96h)	98,2	Mochida et al. 2006. Environ. Toxicol. Chem.25(11): 3058-3064
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	EC50 (96h)	1,9	Bao et al. 2008. Mar. Pollut. Bull.157 (91-93): 616-623
<i>Tigriopus japonicus</i>	LC50 (96h)	170	Bao et al. 2011. Mar. Pollut. Bull.62(5): 1147-1151

Estudos de mortalidade em microalgas *Nitzschia pungens* e para náuplios de *Artemia sp.*, expostos ao piritionato de zinco resultaram em valores de EC₅₀=5,513 µg/l para *N. pungens* e CL₅₀=3,147 mg/l para náuplios de *Artemia sp.* (Jung et al. 2017) demonstrando um elevado nível de toxicidade para organismos aquáticos (Thomas & Brooks 2010). O ensaio agudo (48h) realizado com o peixe *Oryzias latipes* exposto a baixas concentrações de piritionato de zinco (1-10µg/l) resultou em anormalidades morfológicas (deformidade vertebral) na maior concentração (10µg/l) e anormalidade na respiração na menor concentração (1µg/l) (Ohji & Harino 2017). Dentre os principais efeitos relatados do piritionato de zinco citam-se embriotoxicidade mesmo em níveis extremamente baixos, alteração na

expressão de proteínas de choque térmico, genotoxicidade e neurotoxicidade (Nunes et al. 2015).

O piritionato de zinco é rapidamente transformado em compostos menos tóxicos quando expostos à luz solar (Sakkas et al. 2007); no entanto, a radiação solar é atenuada devido a absorção pela matéria particulada e dissolvida na água, limitando essas reações à sua superfície (Costa et al. 2008). Estudos sugerem que piritionato de zinco pode ser persistente em ambientes marinhos sombreados como águas de marinas e portos (Maraldo & Dahllöf 2004), Alguns desses produtos podem ser mais prejudiciais que outros, como o 2,20-ditiobispiridina-N-óxido, um produto de fotólise precoce de 2-mercaptopiridina-N-óxido, que parece ser consideravelmente tóxico (Sakkas et al. 2007), mas menos tóxico que o seu composto parental (Ohji & Harino 2017).

1.6. Ensaios ecotoxicológicos

Ecotoxicidade diz respeito ao potencial que uma substância possui em causar efeitos nocivos aos organismos e depende da concentração, das propriedades das substâncias químicas e do tempo de exposição ao agente tóxico (Magalhães & Ferrão 2008). Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, sob condições controladas, utilizados como ferramentas que permitem detectar efeitos causados por um agente tóxico sobre os organismos, que podem se manifestar em diferentes níveis (estruturas celulares, enzimas, organismos, populações ou comunidades) (Castillo Morales 2004). Para tal, são utilizados organismos qualificados como bons indicadores biológicos, ou seja, sejam sensíveis (baixa tolerância) às diversas substâncias químicas, respondendo por meio de alterações fisiológicas, morfológicas ou comportamentais a diferentes concentrações do agente tóxico, permitindo que os seus efeitos sejam observados e quantificados (Costa et al. 2008; Magalhães & Ferrão 2008).

Os testes de toxicidade podem ser agudos e crônicos, diferindo no tempo de duração e no resultado. Os testes de toxicidade aguda avaliam respostas severas e rápidas, cujas concentrações dos agentes tóxicos produzam efeitos a curto prazo,

observados num intervalo de 0 a 96 horas (Costa et al. 2008). Tem como objetivo estimar a dose ou concentração de um agente tóxico, capaz de produzir um efeito específico exibido pelo organismo-teste, geralmente, a letalidade ou alguma manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade (ASTM 2007). Os testes de toxicidade aguda permitem calcular através de métodos estatísticos os valores da Concentração Letal Média (CL₅₀) ou a Concentração Efetiva Média (EC₅₀), ou seja, a concentração do agente tóxico que é capaz de causar mortalidade (ou imobilidade) a 50% dos organismos depois de um determinado tempo de exposição (ASTM 2007; Magalhães & Ferrão 2008). Os testes de toxicidade crônica avaliam respostas a nível de funções biológicas como reprodução, desenvolvimento, crescimento, maturação, etc. Para tal são utilizadas concentrações subletais de determinado tóxico e a exposição é prolongada atingindo parte muito considerável ou até mesmo todo o ciclo de vida de um organismo-teste (Costa et al. 2008; Magalhães & Ferrão 2008)

1.7. Organismos do género *Daphnia* como organismo teste

A seleção dos organismos teste é uma das principais etapas no desenvolvimento e implementação de testes de toxicidade. Estes devem ser sensíveis aos contaminantes, possuir elevada disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, ser representativo no seu nível trófico, ter ampla distribuição geográfica, facilidade de cultivo, ciclo de vida curto, e boa adaptação às condições laboratoriais e de exposição (Costa et al. 2008). Além disso, as espécies devem possuir uma base de dados que permitam o conhecimento da sua fisiologia, genética e comportamento para que os resultados sejam comparados e interpretados (Castillo Morales 2004; Costa et al. 2008).

Cladóceros são crustáceos planctônicos abundantes em ecossistemas lênticos de água doce, tem sido utilizado como bons indicadores para avaliar qualidade da água, pois preenchem os requisitos acima citados como ciclo de vida curto e reprodução predominantemente assexuada por partenogênese (que permite menor variabilidade genética) e de fácil cultivo em laboratório (Laitano & Matias 2006; Costa et al. 2008; Neves et al. 2015). São classificados

taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera, família Daphnidae (Pechenik 2016). Várias espécies de *Daphnia* tem sido utilizadas como organismos em testes de toxicidade para avaliar o estado dos ecossistemas aquáticos e monitoramento de efluentes industriais, e em testes ecológicos e evolutivos como interações tróficas, migração vertical, hibridação interespecífica, poliploidia, interações entre parasitas, etc.) (Forró et al. 2008; Persoone et al. 2009). *Daphnia longispina* (O.F. Müller, 1776), comumente encontrada em águas doces portuguesas (reservatórios e sistemas lacustres), tem sido utilizada como espécie indicadora para avaliar a qualidade da água (Neves et al. 2015). *Daphnia magna* (Straus) é utilizada como organismo modelo em diversos protocolos de testes de toxicidade aguda e crônica de organizações internacionais de proteção ambiental (OECD, ASTM, US EPA) onde são avaliados vários parâmetros como mortalidade, reprodução, mudanças no comportamento (Persoone et al. 2009).



Fig.1. Fotos de *Daphnia magna* Straus, 1820 e *Daphnia longispina* (O.F. Müller, 1776) (Adaptado de Antunes & Castro (2017).

1.8. Características morfológicas e fisiológicas de organismos do género *Daphnia*.

O género *Daphnia* inclui mais de 100 espécies conhecidas de plâncton de água doce (Forró et al. 2008). São pelágicos, isto é, são encontrados em águas abertas, mas também podem ser vistos agarrados a substratos como plantas

aquáticas ou mesmo sedimentos em lagoas rasas (Pechenik 2016). Possuem o corpo envolto por carapaça cuticular bivalve composta maioritariamente por quitina. Organismos do género *Daphnia* são filtradores e possuem de cinco a seis pares de apêndices na região torácica que produzem uma corrente de água para o aparelho respiratório e de filtragem (responsável por recolher o alimento) que é composto de pequenas partículas suspensas na água (Pechenik 2016; Antunes & Castro 2017).

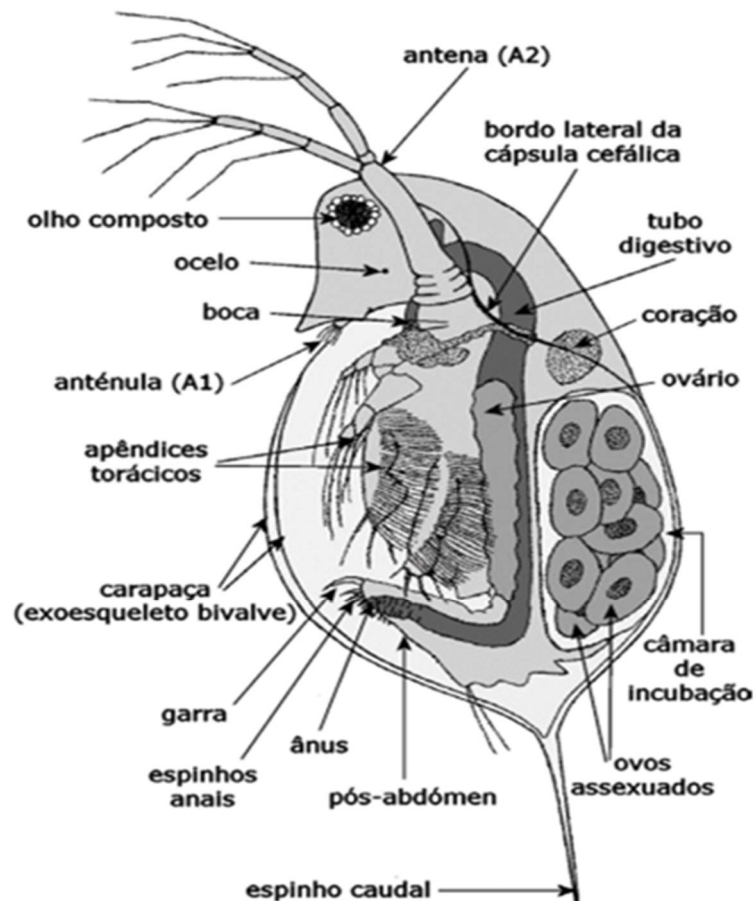


Fig. 2. Ilustração da anatomia interna e externa de *Daphnia* sp. (Adaptado de Antunes & Castro 2017).

A dinâmica da absorção de alimentos (taxa de alimentação) segue um tipo de resposta funcional, onde depende do nível de concentração do alimento. No nível limitante de concentração, a taxa de filtragem (quantidade de água filtrada por unidade de tempo) é máxima e a absorção é proporcional à concentração do alimento. Acima desse nível a taxa de filtragem diminui e a taxa de alimentação é constante. O intestino divide-se em três partes: o esôfago, o intestino médio e o

intestino. O intestino médio é revestido por um epitélio e microvilosidades, possuindo capacidade de absorver moléculas. O sistema nervoso é caracterizado pelo gânglio cerebral, localizado próximo ao intestino e perto do olho. Indivíduos adultos e juvenis do género *Daphnia* têm um grande olho composto, responsável pela orientação durante a natação, e um olho naupliar localizado entre a boca e o olho composto (Ebert 2005).

1.9. Ciclo de vida

Os cladóceros passam por quatro estágios principais ao longo do seu ciclo de vida: ovo, neonato (recém-liberados da câmara de incubação até completarem 24h de idade), juvenil (após 24h até o final da pré-primípara) e adulto (após a primípara, primeira reprodução, sofrer ecdise e o primeiro lote de ovos serem liberados na câmara de incubação; Ebert 2005).

Os indivíduos do género *Daphnia* podem se reproduzir assexuadamente, por partenogênese, ou sexuadamente, dependendo das condições ambientais. Na reprodução assexuada a embriogênese ocorre sem fecundação dando origem a organismos geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras (Antunes & Castro 2017). Os ovos se desenvolvem dentro da fêmea (câmaras de incubação) e são liberados ao ambiente após seu completo desenvolvimento. Em condições ambientais adversas, se reproduzem sexuadamente dando origem a um ovo de resistência (efípia), rico em nutrientes e revestido por um espesso envoltório, que permanece em estado de dormência até que as condições ambientais sejam favoráveis (Forró et al. 2008; Antunes & Castro 2017). Esses fatores de *stress* ambiental também podem ser responsáveis pelo aparecimento do indivíduo macho, que possui menor tamanho em relação à fêmea, primeira antena mais comprida e ausência de processo abdominal (Ebert 2005).

1.10. Ecologia comportamental

O nome em inglês da *Daphnia*, *waterflea*, origina-se do comportamento de salto que vem do batimento para baixo do segundo par de antenas que provoca um

movimento ascendente rápido necessário para se deslocarem através da água (Antunes & Castro 2017), pois sua densidade relativamente alta, faz com que organismos deste género imóveis afundem (Ebert 2005). *Daphnia* possui numerosas estratégias de defesa a ataques de predadores, estas incluem alterações comportamentais, morfológicas e populacionais (Lass & Spaak 2003). A migração vertical refere-se a uma estratégia de defesa onde a população de *Daphnia* migra em direção à superfície da água durante a noite e permanece em águas profundas durante o dia, com objetivo de evitar os predadores visuais (Ringelberg & Van Gool 2003). Essas estratégias possuem custos para o indivíduo à nível metabólico, reprodutivo ou outro (Caramujo & Boavida 2000), e dependem de fatores como presença de predador e alimento, onde mecanismos de “tomada de decisão”, são ativados para a estratégia defensiva mais eficaz e menos onerosa (Ringelberg & Van Gool 2003).

As espécies *Daphnia magna* e *Daphnia longispina* vêm sendo utilizadas como organismos modelos em ensaios com fármacos (Dave & Herger 2012; Du et al. 2016), metais (Biesinger & Christensen 1972; Martins et al. 2017), herbicida (Neves et al. 2015) e outros. Dados referentes aos efeitos ocasionados pelo piritionato de zinco a nível comportamental e bioquímico são escassos ou inexistentes. Relativamente ao paracetamol, muitos estudos têm focado nos efeitos causados por esse fármaco para muitas espécies aquáticas. No entanto não há dados referente aos efeitos no comportamento natatório, para as duas espécies estudadas. Igualmente pouco abundantes são as indicações que ambos os compostos exercem sobre processos chave da fisiologia destas espécies, nomeadamente do ponto de vista bioquímico. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do paracetamol e do piritionato de zinco, por meio de ensaios padronizados, utilizando-se parâmetros como mortalidade, reprodução, comportamento natatório, e determinação de alterações induzidas a nível bioquímico por meio de biomarcadores. Para isso, os efeitos serão avaliados em duas espécies distintas de *Daphnia*, com o intuito de tornar o ensaio mais robusto e abrangente na avaliação da toxicidade, permitindo avaliar potenciais diferenças interespecíficas.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura dos organismos-teste

Animais identificados genotipicamente, provenientes de culturas saudáveis, mantidos em condições laboratoriais apropriadas (luz, temperatura, meio, alimento, número de animais por cultura (OECD 2012), foram utilizados no presente estudo. *Daphnia magna* (clone K6) e *Daphnia longispina* (clone E-89), foram provenientes de culturas monoclonais do Laboratório de Ecologia Aplicada e Ecotoxicologia (*Applied Ecology and Ecotoxicology Laboratory* – applEE), do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM). Para início e renovação da cultura, foram utilizados animais da 3ª a 5ª ninhada. Os animais foram cultivados em meio sintético de água dura (USEPA 1993; ASTM 2007), expostos a fotoperíodo de 16h-luz e 8h-escuro, com temperatura 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), sem arejamento durante sua manutenção (OECD 2012). O meio foi trocado três vezes por semana, com adição de extrato de algas marinhas *Ascophyllum nodosum*, (Antunes et al. 2003; Loureiro et al. 2011), e alga *Raphidocelis subcapitata*, cultivadas em laboratório em condições controladas (Stein 1973), que foi oferecida como alimento a uma porção de $3,0 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$ células/ml para *Daphnia magna* e *Daphnia longispina*, respectivamente (Antunes et al. 2003; Loureiro et al. 2011).

2.2. Compostos químicos e concentrações de teste

Paracetamol ($\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$; número CAS: 103-90-2), com pureza de 99% e piritionato de zinco ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{Zn}$; CAS: 13463-41-7), com pureza de 95%, foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich. Soluções *stocks* de 4mg/l foram preparadas por diluição em água ultrapura (MILLI-Q®) para cada fármaco antes de cada ensaio. As soluções testes foram preparadas a partir da solução *stock* com diluição em meio ASTM. Para o paracetamol e piritionato de zinco as seguintes concentrações (0; 5; 10; 20; 40 e 80µg/l) e (0; 5; 7; 9,8; 13,7 e 19,2µg/l) respectivamente, foram utilizadas para todos os testes, com exceção dos testes de mortalidade onde foram utilizadas outras concentrações e uma solução estoque de 200mg/l foi preparada para o paracetamol.

2.3. Mortalidade

A mortalidade foi avaliada considerando-se o número de neonatos mortos ou imóveis ao fim de 15 segundos após leve agitação, após 48h de exposição a diferentes concentrações dos compostos analisados (OECD 2004). Os valores de mortalidade ao fim da exposição foram utilizados para determinação da EC₅₀ (concentração necessária para produzir 50% de mortalidade/imobilidade na população exposta) (OECD 2004).

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com ambas as espécies de acordo com o protocolo da "*Organization for Economic Cooperation and Development*" - OECD, *Guideline 202*, (OECD 2004). Os recém-nascidos de *D. magna* e *D. longispina* de até 24h de idade foram expostos às seguintes concentrações de paracetamol (mg/l): 0 (controle); 2,25; 3,37; 5,06; 7,59; 11,38; 17,07; 25,6 e 38,4 mg/l, e de piritionato de zinco (µg/l): 0 (controle), 82, 102,5; 128,2; 160,2; 200,2; 250,3; 312,8 e 391 µg/l, com cinco réplicas, contendo 50 ml de cada concentração e cinco neonatos por réplica. Os ensaios foram mantidos sob as mesmas condições de cultivo, sem alimento. As mortalidades dos indivíduos foram registradas às 24h e 48h para análise estatística e determinação da EC₅₀.

2.4. Biomarcadores

Para avaliação dos parâmetros bioquímicos, uma exposição aguda foi realizada para os dois fármacos, utilizando-se o protocolo (OECD 2004) adaptado para concentrações subletais. Neonatos (menos de 24h e nascidos entre a 3ª e 5ª ninhadas) de *D. magna* e *D. longispina* foram expostos a concentrações de paracetamol (µg/l): 0 (controle); 5; 10; 20; 40 e 80 µg/l, e piritionato de zinco (µg/l): 0 (controle); 5; 7; 9,8; 13,7 e 19,8 µg/l, selecionadas considerando sua relevância ecológica em função das concentrações ambientais já referidas na literatura; paracetamol (69,5 µg/l ; Roberts & Thomas 2006) e piritionato de zinco 20ng/l (Thomas et al. 2001) e 15,9 µg/l (Mackie et al. 2004), durante um período de 48h, sem alimento e sob as mesmas condições de cultivo. Foram feitas exposições

diferentes para cada biomarcador bioquímico. Para *D. magna* foram expostos 50 neonatos em frascos contendo 170 ml das soluções de teste, com cinco réplicas por concentração. Para *D. longispina* a exposição foi de 100 animais por réplica. Ao fim de cada exposição, os neonatos foram recolhidos em tubos eppendorf e armazenados a -80°C para posterior homogeneização.

2.4.1. Quantificação da actividade da enzima Catalase (CAT)

Para as determinações enzimáticas da catalase, procedeu-se o descongelamento das amostras e adicionou-se 1ml de tampão fosfato 50mM, pH=7 com 0,1% de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas em sonicador e centrifugadas a 15000g durante 10 minutos a temperatura de 4°C. Os sobrenadantes após centrifugação foram recolhidos em *eppendorf* devidamente identificados.

A catalase é uma enzima responsável pela decomposição de H_2O_2 em $H_2O + O_2$ e pela actividade peroxidica, onde há consumo de H_2O_2 devido a oxidação de doadores de hidrogênio (metanol, ácido fórmico e fenóis). O método consiste na monitorização dessa decomposição, determinada espectrofotometricamente a 240 nm ($\epsilon_{240} = 0,00394 \pm 0,0002$ litros $mmol^{-1}mm^{-1}$), na qual se observa a diminuição da absorbância ($\Delta 240$) (Aebi 1984). A actividade enzimática foi expressa em nmoles de H_2O_2 consumido por minuto, por miligrama de proteína.

2.4.2. Quantificação da actividade das isoenzimas Glutathione S-transferases (GSTs)

Para as determinações enzimáticas das GSTs, procedeu-se o descongelamento das amostras e adicionou-se 1ml de tampão fosfato 50mM, pH=7 com 0,1% de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas em sonicador e centrifugadas a 15000g durante 10 minutos a temperatura de 4°C. Os sobrenadantes após centrifugação foram recolhidos em *eppendorf* devidamente identificados.

A actividade da glutathione S-transferases (GSTs) foi determinada de acordo com Habig et al. (1974). As GSTs catalisam a conjugação da glutathione na sua forma reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), formando um tioeter ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) cuja formação é observada pelo aumento da absorbância detectada espectrofotometricamente a 340 nm, na qual se observa o aumento da absorbância. As actividades enzimáticas foram expressas em nmol de tioeter produzido por minuto, por miligrama de proteína (Habig et al. 1974).

2.4.3. Quantificação da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Para a determinação da actividade da acetilcolinesterase, as amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato 0,1M, pH=7,2 e centrifugadas a 3330g por 3 minutos. Os sobrenadantes após centrifugação foram recolhidos em *ependorf* devidamente identificados.

A quantificação da actividade enzimática da AChE foi efetuada através do método Ellman (Ellman et al. 1961) adaptado para microplacas de 96 poços (Guilhermino et al. 1996). A enzima acetilcolinesterase é responsável pela degradação da acetilcolina em acetato + tiocolina. Neste método, a actividade da enzima é medida através do registro do aumento de absorbância a 414 nm ao longo do tempo, que se dá com o aumento da cor amarela produzida quando a tiocolina é complexada com o DTNB (ditiobisnitrobenzoato). A actividade enzimática foi expressa como nmol do complexo formado por minuto por miligramas de proteína.

2.4.4. Determinação da proteína

A concentração de proteína da amostra foi determinada através do método de Bradford adaptado para microplacas de 96 poços, usando como padrão γ -globulina (Bradford 1976; Qi et al. 2017). Este método baseia-se na ligação de um corante (reagente de Bradford) às proteínas totais, dando origem a um complexo estável e detectável a 595 nm. Essa quantificação permite expressar a actividade enzimática em função da proteína da amostra.

2.5. Avaliação comportamental

Para avaliar os efeitos dos fármacos em estudo no comportamento de *D. magna* e *D. longispina*, neonatos (menos de 24h) e adultos (6 dias) foram expostos a ensaios de 48h a concentrações subletais de paracetamol e piritionato de zinco (OECD 2004; ASTM 2007). Os animais foram expostos às seguintes concentrações de paracetamol ($\mu\text{g/l}$): 0 (controle); 5; 10; 20; 40 e 80 $\mu\text{g/l}$, e piritionato de zinco ($\mu\text{g/l}$): 0 (controle); 5; 7; 9,8; 13,7 e 19,8 $\mu\text{g/l}$, selecionadas considerando sua relevância ecológica em função das concentrações ambientais já referidas na literatura para o paracetamol (Roberts & Thomas 2006) e piritionato de zinco (Thomas et al. 2001; Mackie et al. 2004). Para realização dos ensaios foram utilizadas placas de seis poços com aproximadamente 10ml de solução teste para cada concentração e adicionado aleatoriamente um organismo a cada poço. Cada placa foi composta de um controle e uma concentração a ser testada, totalizando 20 organismos por concentração. Os ensaios foram mantidos sob as mesmas condições de cultivo, sem alimento. Após exposição, os organismos foram transferidos para placas de 24 poços com 2ml das respectivas soluções teste e aclimatados por 10 minutos antes da submissão à análise do seu comportamento pelo sistema de monitorização. Cada placa foi composta por quatro organismos do controle e 20 organismos de uma das concentrações testadas. A avaliação do comportamento locomotor foi realizado em um sistema automatizado de gravação de vídeo (Viewpoint Zebrabox®), que possui suporte para placas multipoços, equipado com luzes LED internas (gravação de luz) e iluminação infravermelha (gravações no escuro), com uma câmera montada para a detecção dos movimentos (Figura 3). Ciclos alternados de luz (5 min) e escuro (5 min), totalizando 20 minutos, foram programados e os dados distância total de natação - TD (mm) e tempo total de natação - TT (s) foram gravados e coletados para análise estatística.

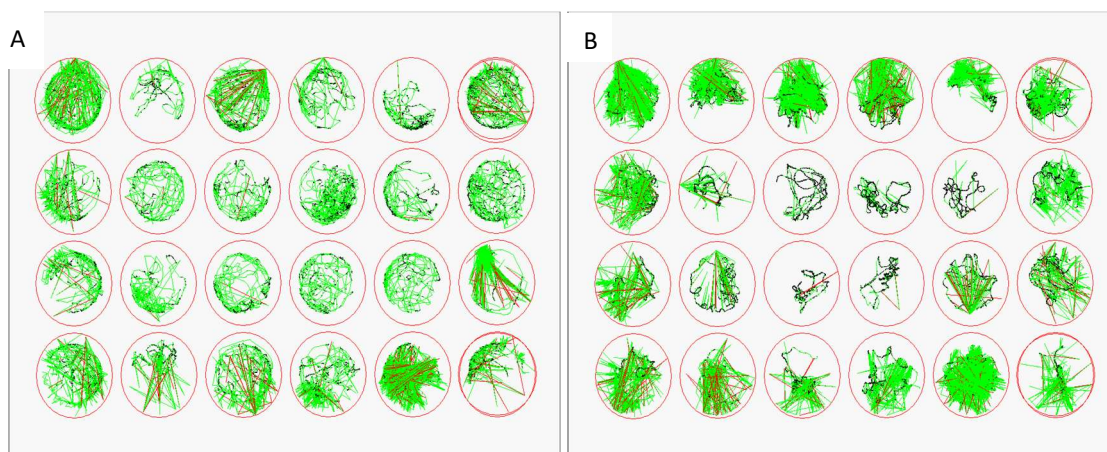


Fig. 3. Movimentos realizados pelos organismos em exposição aos ciclos claro (A) e escuro (B). Primeira coluna refere-se ao controle e as demais aos tratamentos.

2.6. Reprodução

Para avaliar os efeitos do piritionato de zinco no desempenho reprodutivo de *D. magna* e *D. longispina*, neonatos (menos de 24h) foram expostos a ensaios crônicos a concentrações subletais de piritionato de zinco ($\mu\text{g/l}$): 0 (controle); 5; 7; 9,8; 13,7 e 19,8 $\mu\text{g/l}$. Os testes foram realizados de acordo com o protocolo 211 - teste de reprodução em *D. magna* da OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*, por um período de 21 dias, com fluxo semi-estático, fotoperíodo de 16h-luz e 8h-escuro, temperatura 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com adição de extrato de algas marinhas *Ascophyllum nodosum*, (Antunes et al. 2003; Loureiro et al. 2011), e alga *Raphidocelis subcapitata* oferecida como alimento a uma porção de $3,0 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$ células/ml para *Daphnia magna* e *Daphnia longispina*, respectivamente (Antunes et al. 2003; Loureiro et al. 2011). Para realização dos ensaios foram utilizados 10 frascos por concentração contendo 50 ml da solução teste e um organismo por frasco (OECD 2012). O número total de descendentes no fim do teste foi registrado para análise estatística.

2.7. Análise estatística

Para o cálculo da EC_{50} os resultados foram analisados por análise probit para calcular as inclinações das curvas e a EC_{50} com 95% de limite de confiança

($p=0,95$) (OECD 2004). As análises foram realizadas com o recurso ao software IBM SPSS Statistics (versão 25).

Os dados obtidos foram previamente analisados para garantir uniformidade de variância e normalidade (Shapiro-Wilk). Os parâmetros bioquímicos e comportamentais (natação e reprodução) foram analisados através de uma análise de variância (One-Way Anova), seguida, quando necessário ($p<0,05$), de um teste de Dunnett para assim discriminar diferenças significativas dos grupos expostos às concentrações dos fármacos em relação ao tratamento controle. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Os dados são apresentados com média e respectivo erro padrão. As análises foram realizadas com recurso aos softwares Sigmaplot (versão 12.5) e IBM SPSS *Statistics* (versão 25).

III. RESULTADOS

3.1. Mortalidade

O ensaio foi considerado válido, pois os critérios definidos pela norma adoptada foram cumpridos, nomeadamente não houve mortalidade no tratamento controle, e a concentração de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio foi ≥ 3 mg/L em todos os tratamentos (OECD 2004).

No teste agudo de toxicidade, onde o parâmetro mortalidade foi avaliado, foram calculados os valores de EC_{50} referentes a cada fármaco analisado, com respectivos intervalos de confiança (Tabela 3). Em termos de valores de EC_{50} , *D. magna* apresentou maior sensibilidade aos dois fármacos expostos com $EC_{50}=3,180$ mg/l (paracetamol) e $EC_{50}=155,91$ µg/l (piritionato de zinco), em relação a *D. longispina* $EC_{50}=30,45$ mg/l (paracetamol) e $EC_{50}=256,42$ µg/l (piritionato de zinco).

Tabela 3. Valores de EC₅₀ e respectivos intervalos de confiança (IC) de 95 %.

Paracetamol (mg/l)			
Espécies	EC ₅₀ (48h)	limite inferior	limite superior
<i>D. magna</i>	3,18	2,94	3,46
<i>D. longispina</i>	30,45	26,12	37,05
Piritionato de Zinco (µg/l)			
Espécies	EC ₅₀ (48h)	limite inferior	limite superior
<i>D. magna</i>	155,91	147,75	164,36
<i>D. longispina</i>	256,42	228,51	292,42

3.2. Biomarcadores

3.2.1. Catalase

A actividade da catalase foi avaliada após a exposição aguda ao paracetamol e ao piritionato de zinco. Resultados podem ser observados nos gráficos das Figuras 4 e 5.

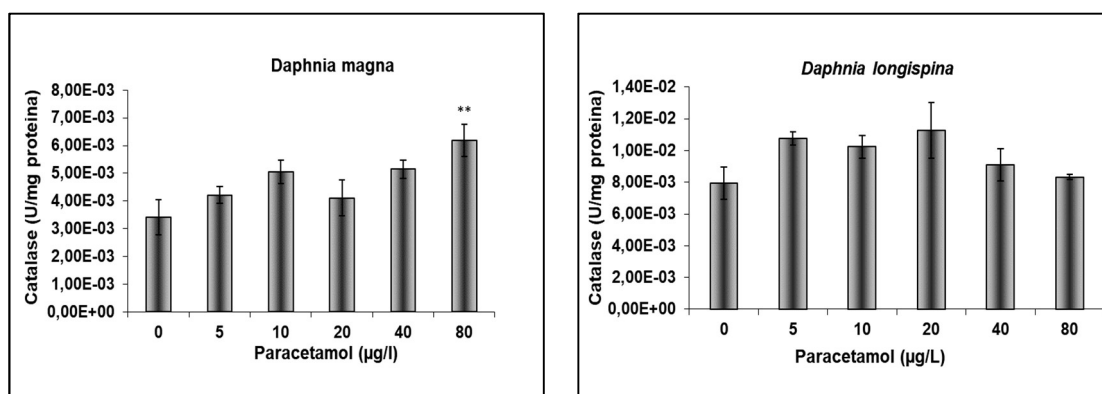


Fig. 4. Actividade da catalase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao paracetamol, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p < 0.05$) entre as diferentes concentrações de paracetamol e o controle negativo.

Em *D. magna*, um aumento significativo na actividade da catalase foi observado para a maior concentração do paracetamol (80 µg/l) ($F=3,752$; $p= 0,012$; g.l = 5; 24). Em *D. longispina*, a actividade da catalase não sofreu alterações significativas ($F=1,910$; $p= 0,130$; g.l = 5; 24), embora um aumento na actividade dessa enzima seja observado (Fig. 4), em relação ao controle.

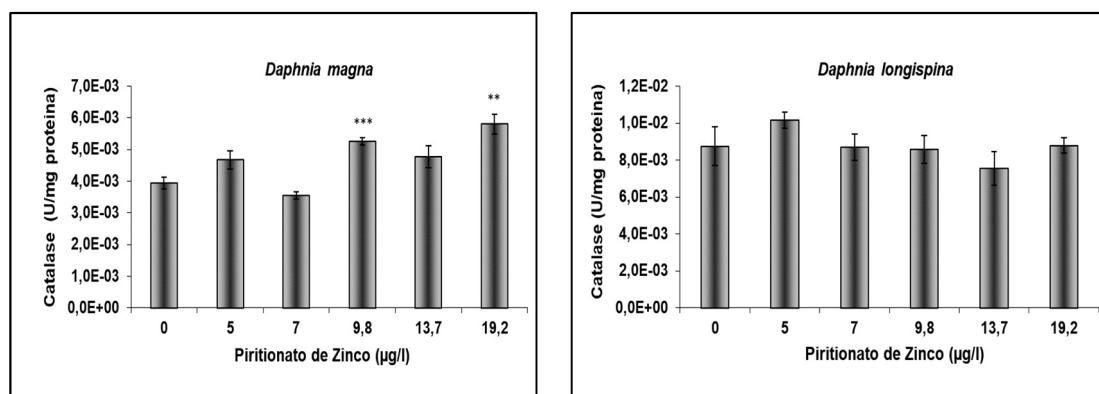


Fig. 5. Actividade da catalase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao piritionato de zinco, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p < 0,05$) entre as diferentes concentrações de piritionato de zinco e o controle negativo.

O piritionato de zinco causou aumento na actividade da catalase em *D. magna*, nas concentrações, 9,8 e 19,2µg/l, ($F = 11,548$; $p < 0,001$; g.l. = 5; 24), observando-se aumento, embora não significativo, na actividade da catalase nas concentrações 5 e 13,7µg/l e diminuição na concentração 7µg/l, relativamente ao controle. Em *D. longispina*, não houve diferenças significativas na actividade da catalase, após exposição ao piritionato de zinco ($F=1,251$; $p=0,317$; g.l. = 5; 24) como se observa na Figura 5.

3.2.2. Glutathione S-transferases (GSTs)

A actividade das GSTs foi avaliada após a exposição aguda ao paracetamol e ao piritionato de zinco. Resultados podem ser observados nos gráficos inseridos nas Figuras 6 e 7.

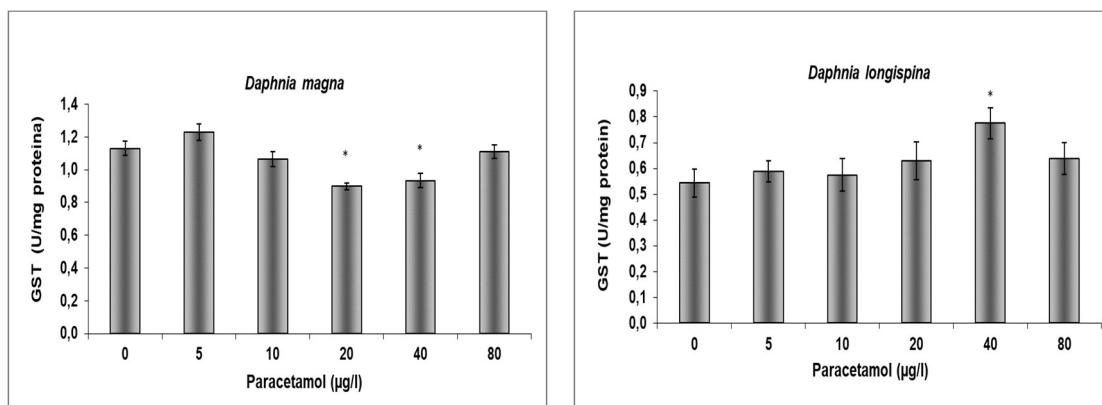


Fig. 6. Actividade das glutathione S-transferases quantificadas em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao paracetamol, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p < 0,05$) entre as diferentes concentrações de paracetamol e o controle negativo.

As exposições ao paracetamol (Figura 6), resultaram em inibição significativa da actividade das GSTs em *D. magna* para duas concentrações intermédias (20 e 40 µg/l) ($F=9,041$ e $p < 0,05$; g.l. = 5; 24) e aumento da actividade enzimática na concentração de 40 µg/l em *D. longispina* ($F=1,866$, $p < 0,05$; g.l. = 5; 24).

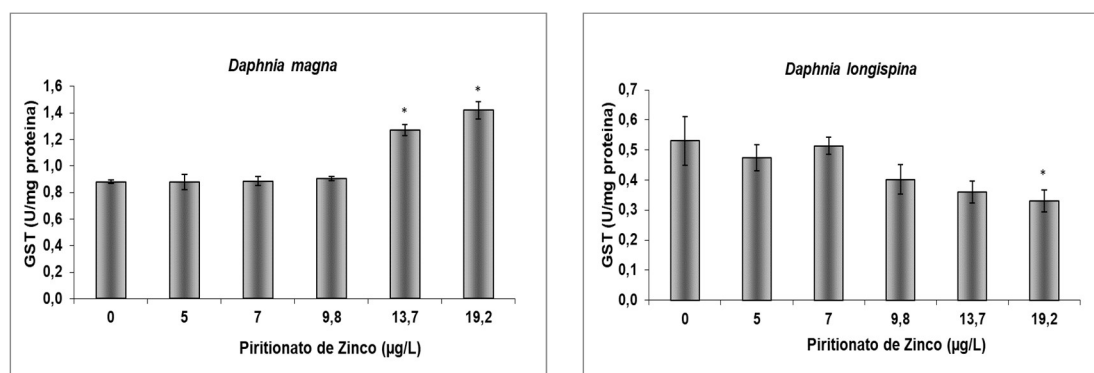


Fig. 7. Actividade das glutathione S-transferases quantificadas em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao piritionato de zinco, U=nmol/min, n=5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p < 0,05$) entre as diferentes concentrações de piritionato de zinco e o controle negativo.

As exposições ao piritionato de zinco (Figura 7) resultaram em aumento significativo na actividade das GSTs em *D. magna* para as maiores concentrações (13,7 e 19,2 µg/l) do piritionato de zinco ($F= 32,704$; $p= 0,05$; g.l. = 5; 24). Em *D.*

longispina, uma inibição da actividade foi observada na maior concentração (19,2µg/l) de piritionato de zinco ($F=1,866$; $p<0,05$; g.l. = 5; 24).

3.2.3. Acetilcolinesterase (AChE)

A actividade da acetilcolinesterase foi avaliada após a exposição aguda ao paracetamol e ao piritionato de zinco. Resultados podem ser observados nos gráficos inseridos na Figuras 8 e 9.

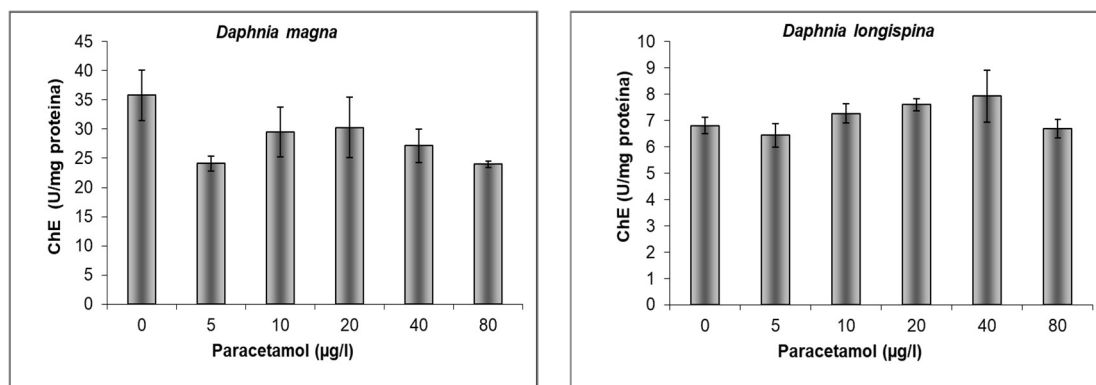


Fig. 8. Actividade da acetilcolinesterase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao paracetamol, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão.

O paracetamol não causou diferenças significativas desta enzima relativamente aos tratamentos e controle em *D. magna* ($F=1,615$; $p=0,194$; g.l. = 5; 24) embora uma inibição da enzima seja observada no gráfico da Figura 8. Em *D. longispina*, não foram observadas alterações na actividade da acetilcolinesterase ($F=1,24$; $p=0,185$; g.l. = 5; 24).

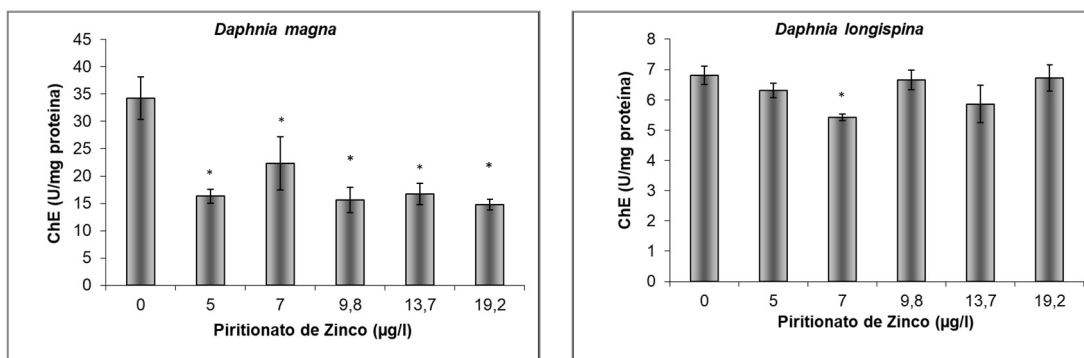


Fig. 9. Actividade da acetilcolinesterase medida em *D. magna* e *D. longispina* após exposição aguda (48h) ao piritionato de zinco, U=nmol/min, n= 5, barras de erro correspondem a erro padrão e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p<0,05$) entre as diferentes concentrações de piritionato de zinco e o controle negativo.

O piritionato de zinco (Figura 9), causou inibição da acetilcolinesterase em *D. magna* ($F=6,598$; $p<0,05$; g.l = 5; 24), em todas as concentrações testadas, e para *D. longispina*, na concentração 7µg/l, em ($F=2,20$; $p<0,05$; g.l = 5; 24).

3.3. Comportamento de natação

As exposições aos fármacos analisados resultaram em alterações no comportamento de natação em *D. magna* e *D. longispina*. A análise estatística encontra-se resumida na Tabela 4 e os resultados comparativos entre as concentrações e controle (teste de Dunnett) na Tabela 5.

Tabela 4. Análise estatística do teste comportamental após exposição ao paracetamol e piritionato de zinco, onde, TT - tempo total de natação (s), TD - distância total percorrida (mm), 300 e 900 (ciclo claro), 600 e 1200 (ciclo escuro), com n=20 e g.l.(5; 114). Valores de F e p encontram-se inseridos de acordo como os ciclos, idade dos organismos e composto analisado.

	CICLOS	<i>D. magna</i> (24h)		<i>D. magna</i> (6 dias)		<i>D. longispina</i> (24h)		<i>D. longispina</i> (6 dias)	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Paracetamol	TT-300	3.958	0.002	3.191	0.01	2.296	0.052	0.883	0.158
	TT-600	4.521	0.001	7.213	0.001	1.292	0.272	0.533	0.218
	TT-900	2.633	0.027	2.015	0.082	5.046	0.05	0.373	0.303
	TT-1200	2.900	0.017	5.254	0.001	0.881	0.497	0.478	0.544
	TD-300	1.319	0.03	3.044	0.08	4.116	0.002	1.641	0.077
	TD-600	0.924	0.468	12.94	0.001	3.84	0.003	1.07	0.164
	TD-900	1.112	0.358	2.953	0.015	10.134	0.001	0.773	0.186
	TD-1200	1.318	0.262	10.986	0.001	4.805	0.001	0.728	0.442
Piritionato de zinco	TT-300	0.765	0.577	4.900	0.001	3.579	0.005	5.124	0.001
	TT-600	0.258	0.935	7.922	0.001	1.247	0.292	3.106	0.012
	TT-900	0.166	0.957	4.136	0.002	3.642	0.004	3.357	0.007
	TT-1200	0.261	0.933	6.457	0.001	1.343	0.251	2.183	0.061
	TD-300	2.190	0.06	3.695	0.004	4.738	0.001	0.999	0.042
	TD-600	1.191	0.097	7.729	0.001	6.741	0.001	2.007	0.083
	TD-900	0.686	0.635	2.965	0.015	7.497	0.418	2.098	0.071
	TD-1200	1.935	0.094	11.845	0.001	4.941	0.001	0.914	0.475

3.3.1. Paracetamol

Em neonatos de *D. magna*, observou-se aumento no tempo total de natação (TT) dos ciclos claro e escuro (Tabela 5) para as duas menores concentrações (5 e 10 µg/l). Em relação a distância total de natação (TD), observou-se aumento para as concentrações 10 e 80 µg/l, no primeiro ciclo claro. Em adultos observou-se aumento no tempo total para as concentrações 20 e 80 µg/l, do primeiro ciclo claro. No ciclo escuro, diminuição do tempo total foi observado na maior concentração (80µg/l). Não foram observadas alterações nos ciclos claros relativamente a distância total. Para os ciclos escuros diminuição na distância total para as duas maiores concentrações (40 e 80 µg/l).

Em neonatos de *D. longispina*, diminuição no tempo total de natação foi observada nas concentrações 5 e 80µg/l, para o segundo ciclo claro, sem alterações nos ciclos escuros. Diminuição na distância total foi observada para as concentrações 5, 10, 40 e 80µg/l, para os dois ciclos analisados. Para os adultos

de *D. longispina* não foram observadas diferenças significativas nos tratamentos em relação ao controle.

Tabela 5. Alterações comportamentais observadas em *D. magna* e *D. longispina* após exposição ao paracetamol e piritionato de zinco, onde, TT - tempo total de natação(s), TD - distância total percorrida(mm), 300 e 900 (ciclo claro), 600 e 1200 (ciclo escuro), (↑) - aumento em relação ao controle, (↓) - diminuição em relação ao controle, e * representa diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett, $p < 0,05$) entre as diferentes concentrações de paracetamol e piritionato de zinco em relação ao controle negativo.

	Idade	CICLOS	Paracetamol (µg/l)					Piritionato de Zinco (µg/l)				
			5	10	20	40	80	5	7	9.8	13.7	19.2
<i>Daphnia magna</i>	Menos de 24h	TT-300	** (↑)	** (↑)								
		TT-900	** (↑)	** (↑)								
		TT-600	** (↑)	** (↑)								
		TT-1200	** (↑)									
		TD-300		** (↑)			** (↑)					
		TD-900										
		TD-600										
		TD-1200										
	6 dias	TT-300		** (↑)			** (↑)	*** (↓)	*** (↓)	*** (↓)	*** (↓)	*** (↓)
		TT-900							*** (↓)		*** (↓)	
		TT-600					*** (↓)		*** (↓)			
		TT-1200					*** (↓)		*** (↓)		*** (↓)	
		TD-300						** (↓)		** (↓)	** (↓)	
		TD-900								*** (↓)	*** (↓)	
		TD-600				*** (↓)	*** (↓)		*** (↓)		*** (↓)	
		TD-1200				*** (↓)	*** (↓)		*** (↓)		*** (↓)	
<i>Daphnia longispina</i>	Menos de 24h	TT-300						** (↓)				
		TT-900	** (↓)				** (↓)	** (↓)	** (↓)	** (↓)		
		TT-600										
		TT-1200										
		TD-300	** (↓)	** (↓)			** (↓)	*** (↓)				
		TD-900	*** (↓)	*** (↓)		*** (↓)	*** (↓)					
		TD-600	** (↓)	** (↑)		** (↓)	** (↓)	*** (↓)	*** (↓)			
		TD-1200	*** (↓)	*** (↓)		*** (↓)	*** (↓)	*** (↓)		*** (↓)		
	6 dias	TT-300						*** (↓)	*** (↓)			
		TT-900						** (↓)	*** (↓)			
		TT-600						** (↓)				
		TT-1200										
		TD-300						** (↓)				
		TD-900										
		TD-600										
		TD-1200										

3.3.2. Piritionato de zinco

Não foram observadas diferenças significativas entre tratamento e controle, na exposição de neonatos de *D. magna*, ao piritionato de zinco. Em adultos, uma

diminuição do tempo total de natação foi observada nas concentrações 5; 9,8; 13,7; 19,2 e 13,7µg/l, para os ciclos claro e nas concentrações 9,8 e 19,2µg/l, para os ciclos escuros. Diminuição da distância total foi observada para as concentrações 5; 13,7 e 19,2 µg/l para os ciclos claros e nas concentrações 9,8 e 19,2 µg/l para os ciclos escuros.

Em neonatos de *D. longispina*, exposições às concentrações 5; 9,8 e 13,7µg/l, resultaram em diminuição no tempo total de natação para os ciclos claros. Nenhuma alteração significativa foi observada para os ciclos escuros.

Diminuição na distância de natação foi observada na menor concentração (5µg/l) para o primeiro ciclo claro, e nas concentrações 5; 9,8 e 13,7µg/l para os ciclos escuros.

Em adultos, as duas menores concentrações (5 e 7µg/l), resultaram em diferenças significativamente relevantes, com diminuição do tempo total de natação para os ciclos claros e na concentração 5µg/l para o primeiro ciclo escuro. Distância de natação foi alterada na menor concentração (5µg/l), para o primeiro ciclo claro.

3.4. Reprodução

O teste foi validado pois a mortalidade das progenitoras não excedeu 20% no final do teste, e o número de descendentes vivos foi maior que 60 (OECD 2012).

Os dados obtidos nos ensaios reprodutivos de *D. magna* ($p=0,419$) e *D. longispina* ($p= 0,003$) expostas ao piritionato de zinco não resultaram em diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. O gráfico 1 representa o número total de neonatos após exposição ao piritionato de zinco.

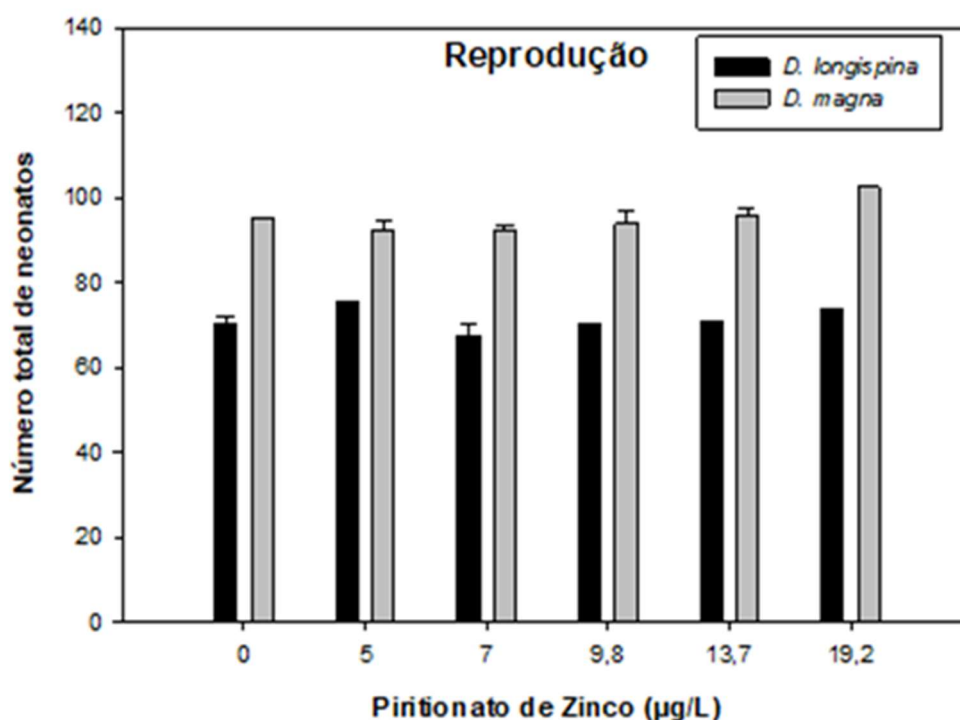


Gráfico 1. Número total de neonatos libertados no teste de reprodução para as duas espécies de *Daphnia*.

IV. DISCUSSÃO

4.1. Mortalidade

4.1.1. Paracetamol

Vários estudos reportaram a toxicidade do paracetamol relativamente a crustáceos, utilizando mortalidade/imobilização como critério de avaliação ecotoxicológica. No presente trabalho o valor de EC_{50} calculado para *D. magna* ($EC_{50}=3,180\text{mg/l}$) foi na mesma ordem de grandeza ao encontrado por Nunes et al. (2014), ($EC_{50}=4,7\text{mg/l}$). Segundo Sánchez-Bayo & Goka (2006), resultados com variabilidade de até uma ordem de grandeza devem ser tratados igualmente, visto que essa variabilidade é comum a este tipo de dados. Por outro lado, o valor calculado para *D. longispina* ($EC_{50}=30,45$), foi inferior em relação ao mesmo estudo de Nunes et al. (2014) ($EC_{50}=65,7\text{mg/l}$). Em ambas as espécies, observa-se uma maior sensibilidade dos organismos utilizados neste trabalho em relação ao referido por Nunes et al. (2014).

A utilização de duas ou mais espécies é importante para estabelecer graus de sensibilidade (Nunes et al. 2014). Estudos anteriormente realizados com as mesmas espécies, *D. magna* e *D. longispina*, expostas a diferentes salinidades, e a sedimentos de lagoas de minas abandonadas, indicaram maior sensibilidade da espécie *D. longispina* (Antunes et al. 2007; Gonçalves et al. 2007). Contrariamente, neste trabalho, *D. magna* mostrou-se mais sensível ao paracetamol em comparação a *D. longispina*. Esses resultados foram compatíveis aos encontrados por Nunes et al. (2014), relativamente às duas espécies expostas ao paracetamol. Valores de EC₅₀ encontrados na literatura para o paracetamol apresentam grande variabilidade para a mesma espécie *D. magna* (4,7 – 50 mg/l) para 48h e (13 – 293 mg/l) para 24h; (Calleja et al. 1994; Henschel et al. 1997; Kim et al. 2012; Du et al. 2016), outros organismos como *Artemia salina* (Webb 2001) e *Dugesia japonica* (Li 2013) evidenciaram valores bastante mais elevados, 577mg/l e 858,6mg/l respectivamente. A toxicidade do paracetamol para organismos aquáticos é ampla e variável como observado na Tabela 1, com organismos mais sensíveis como *D. magna* e menos sensíveis como peixes (ex.: *Oryzias latipes*; Kim et al. 2007). Considerando que os valores necessários para provocar efeitos agudos em organismos aquáticos estão na ordem de grandeza (mg/l), e que os valores encontrados no ambiente são da ordem (µg/l), não é esperado que efeitos agudos, como mortalidade, sejam observados em exposição ao paracetamol a nível ambiental. No entanto, características como consumo elevado, toxicidade, ocorrência e persistência fazem deste fármaco uma prioridade no meio aquático (Voogt et al. 2009), e sua infusão contínua no ambiente pode ocasionar efeitos subtis, tais como alterações a nível celular até modificações a nível de populações, podendo ser confundidos com adaptações evolutivas (Daughton & Ternes 1999).

4.1.2. Piritionato de Zinco

A toxicidade aguda do piritionato de zinco (em termos de EC₅₀ /LC₅₀) foi avaliada por Bao et al. (2011), para espécies aquáticas: cianobactérias - *Chroococcus minor* (7 dias, EC₅₀=51µg/l), *Synechococcus sp.* (96h, EC₅₀=22µg/l); microalgas - *Skeletonema costatum* (96h, EC₅₀=1,7µg/l), *Thalassiosira pseudonana*

(96h, $EC_{50}=0,51\mu\text{g/l}$), *Pyrocystis lúnula* (24h, $EC_{50}=44\mu\text{g/l}$); anêmona do mar - *Aiptasia* sp.(96h, $LC_{50}=410\mu\text{g/l}$); poliquetas -*Hydroides elegans* - larva (48h, $LC_{50}=7,6\mu\text{g/l}$); crustáceos - *Balanus amphitrite* -larva (24h, $LC_{50}=210\mu\text{g/l}$), *Elasmopus rapax* – juvenil (96h, $LC_{50}=29\mu\text{g/l}$), *Tigriopus japonicus* – adulto (96h, $LC_{50}=170\mu\text{g/l}$) e peixe - *Oryzias melastigma* – larva (96h, $LC_{50}=8,2\mu\text{g/l}$) (Bao et al. 2011). No presente trabalho, os valores de EC_{50} calculados para *D. magna* ($155,91\mu\text{g/l}$) e *Daphnia longispina* ($256,42\mu\text{g/l}$) foram da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos para crustáceos zooplancctônicos, nomeadamente *Balanus amphitrite*, *Elasmopus rapax*, *Tigriopus japonicus*, reportado por Bao et al. (2011). Os valores de EC_{50} na ordem de $\mu\text{g/l}$, observados na literatura, e confirmados neste trabalho, indicam que o piritionato de zinco é tóxico para os organismos aquáticos, sendo um ponto importante na avaliação do impacto ecológico desse composto. Dados sobre concentrações ambientais para o piritionato de zinco são escassos na literatura. Amostras obtidas em águas de marinas no Reino Unido continham concentrações 20ng/l (Thomas et al. 2001) e $15,9\mu\text{g/l}$ (Mackie et al. 2004), indicando que níveis ambientais podem causar efeitos tóxicos agudos em organismos mais sensíveis, como microalgas e poliquetas, cujas EC_{50} variam entre $0,51$ e $1,7\mu\text{g/l}$ (Bao et al. 2011). Para as duas espécies analisadas neste trabalho, níveis ambientais de piritionato de zinco, não tendem a produzir efeitos deletérios agudos, entretanto, outros efeitos podem ocorrer em baixas concentrações. Experimentos realizados com mexilhões *Mytilus galloprovincialis* coletados em área portuária na Itália, e expostos a doses subletais de piritionato por 7 dias, demonstrou a persistência deste composto em termos experimentais. Animais do controle indicaram níveis basais de piritionato de zinco, indicando que sua disponibilidade no local de amostragem foi suficiente para ser detectado na população natural. Nos animais expostos, o acúmulo do composto foi proporcional à concentração de exposição e ao tempo, indicando sua potencial ameaça aos organismos de ambientes costeiros (Marcheselli et al. 2010).

Os mecanismos de toxicidade do piritionato de zinco ainda não são claramente elucidados. Estudos apontam para inibição da síntese de ATP em células procarióticas e despolarização das membranas (Dinning et al. 1998). O piritionato de zinco reage com metais por transquelação e é facilmente

transformado em piritionato de cobre e outros metais, originando formas mais estáveis (Madsen et al. 2000). No entanto, não existem dados na literatura que demonstrem que estes mecanismos possam ser responsáveis pelos efeitos agudos do piritionato de zinco. Um outro factor a levar em consideração na interpretação da toxicidade aguda do piritionato de zinco relaciona-se com a possibilidade de formação de metabolitos tóxicos por acção da luz. O piritionato de zinco (e um dos seus potenciais derivados, o piritionato de cobre) são rapidamente transformados por fotólise sob luz solar direta; no entanto em ambientes onde a luz é limitada, podem acumular nos sedimentos (Bao et al. 2014). Sánchez-Bayo & Goka 2006, compararam efeitos do piritionato de zinco nos crustáceos *Cypretta seuratti*, *Ilyocypris dentifera*, *Chydorus sphaericus* e *Daphnia magna* em exposições realizadas na presença e ausência de luz. Os resultados obtidos não conduziram a diferenciação de efeitos para ausência ou presença de luz, em exposições para a mesma espécie. Em relação a sensibilidade entre espécies, cladóceros apresentaram maior sensibilidade do que ostracodes (Sánchez-Bayo & Goka 2006). Em estudo realizado por Ohji & Harino 2017, peixes da espécie *Oryzias latipes* foram expostos a duas concentrações, 1 e 10 µg/l, de piritionato de cobre, piritionato de zinco, e seus produtos de degradação. Toxicidade foi evidenciada nas primeiras 12h, com 100% de mortalidade para piritionato de cobre nas duas concentrações (1 e 10µg/l) e na maior concentração (10µg/l) para o piritionato de zinco, entretanto, para os produtos de degradação as concentrações analisadas não causaram mortalidade durante 48h, demonstrando a maior toxicidade do piritionato de cobre frente ao piritionato de zinco e que os efeitos agudos dos produtos de degradação dos dois piritionatos eram menos tóxicos que os compostos parentais; apesar de não serem evidenciados efeitos letais para os produtos de degradação, efeitos como anomalias na respiração e natação foram observados. A maior toxicidade do piritionato de cobre frente ao piritionato de zinco também foi reportada no estudo com uma espécie de peixe marinho (*Pagrus major*) e um crustáceo (*Heptacarpus futilirostris*) (Mochida et al. 2006). A avaliação da toxicidade em misturas de piritionato de cobre e zinco, foram estudadas em *Artemia salina*, devido a facilidade de transquelação desses compostos e possibilidade de coexistência no ambiente aquático. A EC₅₀ foi calculada para os dois compostos

com valores de 830 µg/l para piritionato de zinco e 1000 µg/l para piritionato de cobre e efeitos sinérgicos foram observados na mistura (Koutsaftis & Aoyama 2007). Efeitos sinérgicos também foram observados aquando da exposição de combinações de piritionato de zinco e cobre em diatomáceas (nomeadamente, *Thalassiosira pseudonana*), larvas de poliquetas *Hydroides elegans* e anfípodes *Elasmopus rapax* (Bao et al. 2008). No entanto, e mesmo considerando a possibilidade de transquelação de piritionato de zinco na sua forma de cobre, não é de supor que nas condições adoptadas no presente estudo essa hipótese possa ser responsável por um aumento apreciável da toxicidade do piritionato de zinco.

A sensibilidade dos organismos aquáticos ao piritionato de zinco é notória em diversos estudos como demonstrado na Tabela 2, e as concentrações ambientais podem culminar em efeitos tóxicos severos em espécies mais sensíveis. O estudo da sua toxicidade em organismos dulçaquícolas é de suma importância para avaliar os impactos causados, visto que este composto é habitualmente utilizado, não só como agente antiincrustante, mas também na forma de champôs anticasca (Schwartz et al. 2011), que são libertados nas redes de tratamentos de esgoto, podendo facilmente chegar a esses ambientes. Contudo, para as espécies estudadas, os níveis de piritionato de zinco necessário para desencadear efeitos tóxicos agudos, como mortalidade, superam os valores encontrados em concentrações ambientais.

4.2. Biomarcadores

As concentrações de paracetamol e piritionato de zinco encontrados no ambiente são na ordem de µg/l ou ng/l, não sendo capazes de afetar organismos de maneira drástica como mortalidade como ficou claro na secção anterior da discussão. No entanto, a libertação contínua dessas substâncias no ambiente, em doses necessariamente subletais, podem causar danos nos organismos inicialmente a nível suborganismal, que pode ter consequências ao longo do tempo em populações e comunidades. Esses efeitos preliminares podem fornecer informações importantes de como essas substâncias podem interferir nos organismos, servindo de alerta precoce de quais efeitos tóxicos podem causar, e

se manifestam a nível de suas funções individuais e aptidões dos organismos (Duquesne & Küster 2010). A comparação a nível suborganismal (como alterações bioquímicas), e ao nível da população (como desempenho reprodutivo e alterações comportamentais), oferecem uma estimativa mais ampla e ecologicamente mais relevante dos possíveis efeitos ambientais que essas substâncias podem causar. Neste trabalho, os resultados obtidos, indicaram que os fármacos analisados podem causar efeitos a nível bioquímico, com ênfase para o piritionato de zinco que causou alterações nos três biomarcadores analisados (AChE, CAT e GSTs), com maior alteração em indivíduos de *D. magna* em relação à *D. longispina*. Considerando que as exposições ao paracetamol e piritionato de zinco decorreram em concentrações ambientalmente relevantes, achados dessa natureza são importantes para se tentar perceber os efeitos ambientais causados por essas substâncias.

4.2.1. Defesa antioxidante

A toxicidade dos xenobióticos pode ser gerada pelo desequilíbrio das defesas antioxidantes onde espécies reativas de oxigênio produzidas, superam o potencial de defesa, causando ineficiência no reparo dos danos oxidativos (Dorval & Hontela 2003). Esse desequilíbrio denominado *stress* oxidativo, pode indicar inícios de alterações importantes como degradação de proteínas, inativação enzimáticas, peroxidação lipídica e danos no DNA. Enzimas especialmente adaptadas, como as superóxidos dismutases (SOD), catalase e glutathione peroxidases protegem os organismos aeróbicos dos danos causados por essas espécies reativas de oxigênio (Winston & Di Giulio 1991).

A catalase é um importante protetor contra efeitos prejudiciais de natureza oxidante, devido a sua principal função que é a degradação do peróxido de hidrogênio, comum em cenários de *stress* oxidativo, resultante da degradação da superóxido dismutase, enzima a montante na cascata de defesa oxidativa (Oruc et al. 2004; Brandão et al. 2011).

4.2.1.1. Paracetamol

No presente trabalho, paracetamol induziu aumento na actividade da catalase em *D. magna*, indicando a ocorrência de aumento na produção de peróxido de hidrogênio e ativação de defesas antioxidantes. Stress oxidativo induzido pelo paracetamol em espécies aquáticas foram descritos por vários autores na literatura. No estudo conduzido por Masteling et al. (2016), *Daphnia magna* exposta ao paracetamol desencadeou um quadro de stress oxidativo com ativação das principais enzimas antioxidantes, inclusive catalase. Nossos resultados são condizentes aos encontrados por esse autor. Aumento da catalase também foi observada na exposição do mexilhão *Dreissena polymorpha* a concentrações ambientais de paracetamol (0,154 a 1,51 µg/l), indicando um quadro de stress oxidativo, confirmado com o aumento na actividade da enzima superóxido dismutase (Parolini et al. 2010). Aumento na actividade da catalase foi igualmente evidenciado em indivíduos do bivalve *Ruditapes philippinarum* expostos ao paracetamol nas concentrações 0,05; 0,5 e 5mg/l (Correia et al. 2016). Estudos de períodos de exposição ao paracetamol e recuperação em *Ruditapes philippinarum* indicaram danos oxidativos com comprometimento de várias vias bioquímicas durante a exposição, e que, após períodos de recuperação, os organismos tendem a restabelecer seus estados bioquímicos naturais (Nunes et al. 2017). Em peixes expostos ao paracetamol, o aumento da catalase foi observado em *Oncorhynchus mykiss* (Ramos et al. 2014) e *Oreochromis mossambicus* (Kavitha et al. 2011). É importante lembrar que as concentrações utilizadas neste trabalho são similares às concentrações ambientais já referidas na literatura, sugerindo que efeitos tóxicos podem ocorrer a nível ambiental. Estes dados reforçam o potencial tóxico do paracetamol frente aos organismos aquáticos.

Respostas diferentes foram obtidas em *D. longispina*, e a actividade da catalase não sofreu aumento significativo, sugerindo que o paracetamol não desencadeou a formação de peróxido de hidrogênio suficiente para causar um aumento significativo na actividade dessa enzima (Brandão et al. 2011). A semelhança desses resultados, exposição ao paracetamol não resultou em alteração dessa enzima em *D. magna* (Oliveira et al. 2015) e em *Mytilus galloprovincialis*, como descrito por Solé et al. (2010). Paracetamol também não

causou alterações significativas na actividade da catalase de moluscos *Corbicula flumínea* (Brandão et al. 2011) e na enguia europeia *Anguilla anguilla* (Nunes et al. 2015). Esses resultados podem indicar que padrões de respostas podem ser variáveis entres espécies, mas também dependente da dose. Considerando que os valores de EC₅₀, calculadas neste trabalho, para *D. magna* (4,7mg/l) é quase dez vezes menor do que o valor para *D. longispina* (30,45mg/l) é de se esperar que efeitos maiores sejam visualizados em *D. magna* do que em *D. longispina* em menores concentrações.

Semelhantes a catalase, o grupo de isoenzimas glutathione-S-transferases, possui actividade de defesa anti-oxidante, e são importantes na biotransformação e excreção de uma ampla gama de compostos, através da catálise da conjugação da glutathione reduzida (Leaver & George 1998). Este grupo de enzimas tem papel crucial na desintoxicação de xenobióticos, uma vez que aumentam a biotransformação e taxas de excreção desses compostos, reduzindo sua toxicidade (Dorval & Hontela 2003). A um custo elevado, estas isoenzimas podem fazer reagir espécies reativas de oxigênio com glutathione reduzida (GSH), ocasionando o esgotamento da GSH a nível intracelular, o que pode ocasionar dano oxidativo (Oruc et al. 2004).

Neste trabalho, inibição das GSTs foi observada em *D. magna*, após exposição ao paracetamol. Comprometimento na actividade das GSTs também foi reportado por Antunes et al. (2013) em *Venerupis decussata*, após exposição ao paracetamol. No entanto, esses resultados não são exclusivos deste trabalho. Diminuição na actividade das GSTs foi observada em indivíduos de amêijoia asiática *Corbicula flumínea* expostos ao paracetamol nas concentrações 0,48; 4,82 e 532,78 mg/l expostas por 96h, e nas concentrações 30,98 e 61,95µg/l por 28 dias (Brandão et al. 2011). Esses resultados não estão de acordo com o esperado, onde a ocorrência de modificações oxidativas causariam o aumento da actividade dessa enzima. No entanto, não se exclui que o *stress* oxidativo pode ser a base de efeitos deletérios, incluindo inativação enzimática (Oliveira et al. 2015). Além disso, comprometimento de uma via metabólica de fase II (principal via de metabolização

de xenobióticos, inclusive paracetamol), podem contribuir para o aumento da toxicidade (Brandão et al. 2011).

As duas espécies avaliadas obtiveram resultados divergentes em relação a essa enzima. Aumento na actividade das GSTs foi observado em indivíduos de *D. longispina* expostas ao paracetamol. Esses achados estão de acordo com vários trabalhos descritos na literatura, como os descritos por Parolini et al. (2010) em mexilhões *Dreissena polymorpha* expostos a concentrações ambientais de paracetamol; Nunes et al. (2015) descreveu aumento de GSTs nas enguias europeias *Anguilla anguilla* após exposição a concentrações de 625 µg/l de paracetamol. Aumento na actividade das GSTs também foi observado em *Venerupis philippinarum* expostos ao paracetamol (Antunes et al. 2013). Estudos de períodos de exposição e recuperação em *Ruditapes philippinarum* indicaram danos oxidativos ao paracetamol em baixas concentrações (25µg/l) com comprometimento de várias vias bioquímicas, evidenciando aumento das GSTs e superóxido dismutase, e que após períodos de recuperação os organismos tendem a restabelecer seus estados bioquímicos naturais (Nunes et al. 2017). Aumento na actividade das GSTs também foram observadas em *Oncorhynchus mykiss* (Ramos et al. 2014) e *Oreochromis mossambicus* (Kavitha et al. 2011) após exposição ao paracetamol. Em *D. magna* o aumento da actividade das GSTs foi observado após exposição a concentrações 3,7 a 4,5mg/l de paracetamol (Masteling et al. 2016), no entanto as concentrações superavam a magnitude das que foram analisadas neste trabalho.

O resultado mais provável da exposição ao paracetamol é o *stress* oxidativo (Nunes et al. 2014). Neste estudo, resultados com *D. magna* evidenciaram essa afirmação, com alteração da catalase e GSTs, sendo reforçado por diversos autores. No entanto, não se pode afirmar que o aumento da actividade das GSTs após exposição de *D. longispina* ao paracetamol está diretamente relacionado ao estresse oxidativo, visto que não houve alteração na actividade da catalase. Como as GSTs são enzimas de conjugação de fase II em invertebrados (Solé et al. 2010), este aumento pode estar relacionado a metabolização do paracetamol, com a desintoxicação de NAPQI conjugando-o com a glutathione, tornando-o hidrossolúvel para ser excretado. No entanto não se pode descartar que o aumento das GSTs

esteja relacionado ao *stress* oxidativo, visto que estas enzimas também podem exercer efeitos antioxidantes, convertendo espécies reativas de oxigênio para diminuir sua toxicidade, entretanto para que isso ocorra, a glutathione reduzida intracelular pode ser extinta e causar dano oxidativo (Vlahogianni et al. 2007) .

Semelhante ao que ocorreu neste trabalho para as duas espécies estudadas (*D. magna* e *D. longispina*), Antunes et al. (2013) também obteve inibição na actividade GSTs para *Venerupis decussata* e aumento para *Venerupis philippinarum*. Esses achados podem ser associados a diferenças de sensibilidade entre as espécies, que podem estar relacionados a diferenças interespecíficas, ou mecanismos subjacentes de desintoxicação (Antunes et al. 2013).

4.2.1.2. Piritionato de Zinco

A exposição a piritionato de zinco parece estar associada ao aumento do *stress* oxidativo. A capacidade do piritionato de zinco em causar danos oxidativos foi estudada utilizando timócitos de rato. Piritionato de zinco demonstrou aumentar letalidade nas células que sofriam *stress* oxidativo induzido. O piritionato de zinco sozinho aumentou o nível de zinco intracelular, a quantidade de aniões superóxido, e a aplicação simultânea com o peróxido de hidrogênio resultou em efeitos sinérgicos, indicando também uma ação citotóxica severa (Oyama et al. 2012). No presente estudo, piritionato de zinco desencadeou defesas oxidantes em *D. magna* alterando as actividades enzimáticas das GSTs e catalase e em *D. longispina* alterando a actividade das GSTs. Considerando que a exposição ao piritionato de zinco decorreu em concentrações ambientalmente relevantes (5 a 19,2 µg/l), achados dessa natureza são importantes para se tentar perceber os efeitos ambientais causados por essa substância.

Em *D. magna*, o aumento da catalase e da GSTs indicam o potencial do piritionato de zinco em causar danos oxidativos. A ativação de mecanismos de defesa indica a superprodução de espécies reativas de oxigênio, conduzindo a um cenário de *stress* oxidativo evidente, que podem desencadear efeitos graves individuais a curto prazo e populacionais a longo prazo. Isso é extremamente

relevante, pois as concentrações utilizadas nas exposições podem ser encontradas no ambiente aquático.

Em *D. longispina*, piritionato de zinco não desencadeou alterações na actividade da catalase, sugerindo que não houve produção de peróxido de hidrogênio suficiente para alterar essa enzima; além disso inibição das GSTs foi observada. No entanto, considerando a capacidade de causar *stress* oxidativo em *D. magna*, não se exclui que o *stress* oxidativo pode ser a base de efeitos como inibição enzimática. Para além disso causa preocupação a inibição de uma enzima de fase II, visto que é uma das vias de desintoxicação de xenobióticos.

4.2.2. Neurotoxicidade

A acetilcolinesterase desempenha um papel regulador da transmissão nervosa colinérgica, pois é responsável pela degradação hidrolítica da acetilcolina, após sua liberação nas fendas sinápticas dos sistemas sensoriais e neuromusculares da maioria dos animais. O acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas resulta em estimulação do sistema nervoso central e periférico, resultando em efeitos neurotóxicos importantes (Nunes et al. 2005; Xuereb et al. 2009). A actividade da acetilcolinesterase tem sido utilizada como biomarcador na avaliação de diversos poluentes ambientais, como pesticidas, metais, detergentes e drogas farmacêuticas (Sismeiro-Vivas et al. 2009; Nunes et al. 2014), devido a actividade anticolinesterásica desses compostos que inibem a degradação da acetilcolina (Nunes et al. 2005).

4.2.2.1. Paracetamol

No presente trabalho, a exposição ao paracetamol não desencadeou efeitos neurotóxicos nas espécies estudadas. Este achado não foi condizente com o trabalho conduzido por Oliveira et al. 2015, que demonstrou a ocorrência de inibição da actividade da acetilcolinesterase em indivíduos de *D. magna* expostos a concentrações de 0,1 e 1mg/l de paracetamol em 48h, no entanto, as concentrações utilizadas por esse autor superam em ordem de grandeza as

utilizadas neste trabalho, indicando a relação dose-resposta induzida por esse fármaco. Outros trabalhos apontam para os efeitos neurotóxicos causados pelo paracetamol, evidenciados pela inibição dessa enzima, em espécies tão diversas como o peixe *Anguilla anguilla* (Nunes et al. 2015); os bivalves *Ruditapes philippinarum* (Nunes et al. 2017), e *Mytilus galloprovincialis* (Solé et al. 2010). Para justificar esta alteração, foi sugerida uma relação entre a ocorrência de *stress* oxidativo e a inibição directa da enzima, por efeito oxidativo. De fato, essa relação já foi evidenciada em estudos, como demonstrou Delwing-de Lima et al. (2010), ao induzir *stress* oxidativo em ratos pela adição de derivados de guanidinas, observando a inibição das colinesterases (acetilcolinesterase e butilcolinesterase); estes efeitos foram posteriormente revertidos após a administração de compostos antioxidantes, determinando a natureza oxidativa da inibição dessa enzima. Weiner et al. (1994) também demonstrou que espécies reativas de oxigênio inativaram a acetilcolinesterase de peixe *Torpedo californica* alterando seu estado conformacional. Neste trabalho, *stress* oxidativo após exposição ao paracetamol não foi evidente, como discutido em secção anterior para as duas espécies estudadas, conduzindo-nos a relacionar que a actividade da acetilcolinesterase não foi alterada por falta de *stress* oxidativo evidente, indicando que as defesas antioxidantes ativadas foram eficazes. Estes resultados são ecologicamente relevantes ao nos conduzir para a relação entre o *stress* oxidativo e inibição enzimática conforme descrito por Delwing-de Lima et al. (2010) e Weiner et al. (1994). No entanto, é necessário que novos estudos sejam conduzidos a fim de aprofundar o conhecimento da relação entre *stress* oxidativo e efeitos neurotóxico (inibição da acetilcolinesterase), visto que poluentes ambientais, incluindo paracetamol, podem ser potencialmente tóxicos para as espécies mais sensíveis.

4.2.2.2. Piritionato de zinco

Os poucos estudos existentes para avaliar a neurotoxicidade do piritionato de zinco utilizaram peixes como organismo modelo. Em peixes da espécie *Fundulus heteroclitus*, exposição ao piritionato de zinco e seus produtos de degradação, resultaram na inibição da acetilcolinesterase apenas após exposição

aos seus produtos de degradação, sem alterações ao composto parental (Mochida et al. 2009). Esses resultados foram condizentes com o estudo realizado em *Gambusia holbrooki* exposta ao piritionato de zinco, onde não foram observadas alterações nas actividades da acetilcolinesterase (Nunes et al. 2015). No entanto esse ensaio foi feito na ausência de luz, não permitindo a sua fotodegradação e a geração de produtos de fotodegradação potencialmente tóxicos. No presente trabalho, o piritionato de zinco inibiu a acetilcolinesterase nas duas espécies estudadas. O ensaio experimental foi realizado na presença de luz, e teoricamente pode ter havido formação de produtos de degradação, o que pode justificar os resultados obtidos; porém, não foram feitas determinações químicas para confirmar se o composto parental foi degradado.

As alterações na actividade da acetilcolinesterase indicam o exercício de neurotoxicidade do piritionato de zinco relativamente às espécies estudadas. Considerando que o piritionato de zinco apresentou grande capacidade de causar *stress* oxidativo em *D. magna*, e alterações enzimáticas em *D. longispina* que podem estar associadas a produção de espécies reativas de oxigênio, nossos resultados indicam que os efeitos neurotóxicos do piritionato de zinco podem estar também relacionados ao *stress* oxidativo. Essa relação já foi evidenciada em estudos, como referido em secção anterior (Weiner et al. 1994; Delwing-de Lima et al. 2010). No entanto, e apesar da relevância ecológica dos resultados pois as referidas modificações ocorreram para níveis baixos do piritionato de zinco, dados na literatura são escassos, sendo necessário uma abordagem com outras espécies para aprofundar o conhecimento sobre efeitos neurotóxicos do piritionato de zinco em condições realistas.

4.3. Alterações comportamentais

Comportamentos individuais de natação em *Daphnia* resultam em comportamentos populacionais importantes de defesa, como migrações verticais e horizontais (Dodson & Ramcharan 1991; Burks et al. 2002; Lass & Spaak 2003). A análise desse movimento em escala individual, contribui para a compreensão das adaptações às diferentes condições ambientais, bem como a dinâmica

populacional (Ziarek et al. 2011). A natação da *Daphnia* depende do tamanho do corpo. Adultos costumam nadar mais que juvenis, atingindo maiores velocidades médias e distâncias (Dodson & Ramcharan 1991). A natação pode ser afetada por vários fatores, como luz, temperatura da água, presença de alimentos e predadores (Hamza & Ruggiu 2000; Ziarek et al. 2011). Várias substâncias podem afetar a mobilidade de *Daphnia*, sendo este um importante parâmetro em testes ecotoxicológicos (Duquesne & Küster 2010). Alterações na mobilidade foram descritas em exposições a pesticidas (ex. Carbaril; Dodson et al. 1995), fármacos (hormônios; Goto & Hiromi 2003), toxinas de cianobactérias; (Ferrão-Filho et al. 2014; Restani & Fonseca 2014), metais (Cádmio; Wolf et al. 1998), inseticidas organofosforados (Duquesne & Küster 2010), entre outros. Mudanças no comportamento de natação podem ser muito subtis, de difícil observação a olho nu, e análise digital e gravação em vídeo surgem como ferramentas sensíveis capazes de monitorar vários parâmetros relacionados a mobilidade (Dodson et al. 1995). Neste trabalho, tempo de natação e distância percorrida foram utilizados como parâmetros de actividade locomotora, tendo os organismos sido expostos a ciclos de claro e escuro. Neonatos (menos de 24h) e adultos (6 dias) de *Daphnia magna* e *Daphnia longispina* reagiram de formas particulares aos ciclos de claro e escuro, após exposição ao piritionato de zinco e ao paracetamol. No presente estudo, observou-se que as alterações comportamentais de natação não seguiram um padrão dose-resposta claro, e as alterações foram difusas em relação aos parâmetros e ciclos expostos, com alguns momentos de excitação (aumento da distância e tempo) ou inibição (diminuição da distância e tempo) comportamentais. Poucos trabalhos foram desenvolvidos analisando a actividade locomotora de organismos aquáticos após exposição ao paracetamol e piritionato de zinco, e nenhum envolveu as duas espécies do presente estudo. Embriões de peixe zebra (*Danio rerio*) expostos ao paracetamol não sofreram alterações em suas actividades locomotoras (Selderslaghs et al. 2013; Xia et al. 2017). Em peixes da espécie *Oryzias latipes*, piritionato de zinco não causou alterações comportamentais, no entanto seus produtos de degradação causaram efeitos no comportamento de natação (hiperactividade) (Ohji & Harino 2017).

Neste trabalho, as exposições a baixas concentrações de paracetamol induziram alterações comportamentais em *D. magna* e *D. longispina*. Respostas comportamentais são indicadores sensíveis de *stress* porque integram processos bioquímicos e fisiológicos (Chevalier et al. 2015). Tais alterações podem ser relacionadas com a capacidade desse fármaco em induzir *stress* oxidativo. Como referido em sessões anteriores, vários autores relataram o *stress* oxidativo induzido pelo paracetamol, que pode desencadear desde respostas adaptativas nos sistemas protetores, modificar macromoléculas, ou causar lesões celulares e de forma mais severa a morte (Bajt et al. 2006; Solé et al. 2010). Neste trabalho, ativação de defesas antioxidantes foram observadas em *D. magna* enquanto que em *D. longispina*, apesar da enzima catalase não ser afetada, as alterações das GSTs indicam o potencial tóxico desse fármaco para as duas espécies estudadas, o que pode justificar as alterações causadas no comportamento após exposição a esse fármaco. Para além das diferenças entre as espécies, a idade também influenciou nas alterações comportamentais como observado neste trabalho. O fato de neonatos e adultos de *Daphnia magna* apresentarem diferenças comportamentais significativas reflete o poder tóxico desse fármaco durante a vida desta espécie, enquanto que *D. longispina* parece apresentar maior potencial em desintoxicar o paracetamol em indivíduos adultos. No entanto, adultos não foram submetidos a exposições para determinação dos biomarcadores bioquímicos, necessitando mais estudos para se compreender tais mecanismos.

Neste trabalho, piritionato de zinco causou inibição da actividade da AChE nas duas espécies expostas. A acetilcolinesterase desempenha papel importante no funcionamento do sistema neuronal de cladóceros (Solé et al. 2010). Estudos com *D. magna* indicaram a relação entre inibição da actividade da acetilcolinesterase e alteração comportamental como relatado por Duquesne & Küster (2010), em exposição a inseticida organofosforado. Cladóceros possuem um sistema neural ou mecanismos neurológicos primitivos e acetilcolinesterase parece responder a uma diversidade de xenobióticos, incluindo fármacos (Solé et al. 2010). No entanto, não podemos concluir que as alterações comportamentais estão diretamente relacionadas aos efeitos neurotóxico do piritionato de zinco. As alterações da acetilcolinesterase foram observadas em neonatos e neste trabalho,

somente adultos de *D. magna* apresentaram alterações comportamentais, pelo que estes resultados podem estar associados a outros tipos de estressores, o que faz necessário desenvolver mais estudos especialmente a nível de marcadores bioquímicos em adultos de *D. magna*. No entanto, potencial neurotóxico do piritionato de zinco não pode ser descartado - em *D. longispina*, as alterações comportamentais foram observadas em ambas as idades. Nesta espécie, alterações comportamentais parecem estar diretamente relacionadas ao potencial neurotóxico do piritionato de zinco, devido a alteração da actividade da acetilcolinesterase. Inibição da actividade da acetilcolinesterase vem sido associada ao *stress* oxidativo (Weiner et al. 1994; Delwing-de Lima et al. 2010). No entanto, nesta espécie as defesas antioxidantes não parecem terem sido totalmente ativadas após exposição ao piritionato de zinco, pois não houve alteração da actividade da catalase. Tal não exclui a ocorrência de alterações pró-oxidantes de outro tipo, pois *stress* oxidativo pode causar inibição enzimática, e para esta espécie GSTs e acetilcolinesterases foram inibidas. No entanto, estudos mais amplos incluindo determinação da actividade de superóxido dismutase, seriam necessários para confirmar um quadro de *stress* oxidativo; além disso exposições em adultos seriam necessárias para confirmar a relação entre alterações nos marcadores bioquímicos (como acetilcolinesterase) e alterações comportamentais em adultos.

Apesar dos dados escassos na literatura, os resultados obtidos reforçam a sensibilidade destes dois organismos, que mesmo expostos a concentrações subletais podem sofrer efeitos a nível de suas funções. Esses resultados são extremamente relevantes, pois mudanças na actividade locomotora podem interferir na relação predador-presa causando mudanças na dinâmica populacional dessas espécies (Dodson et al. 1995).

4.4. Reprodução

Os dados resultantes dos ensaios de reprodução conduzidos neste estudo não indicaram diferenças significativas no número de neonatos produzidos pelas fêmeas de *D. magna* e *D. longispina* expostas a concentrações ambientalmente

relevantes de piritionato de zinco. Organismos do género *Daphnia* expostos a fatores de *stress*, como a presença de predadores, desencadeiam defesas reprodutivas, onde há efeitos na dinâmica populacional, com diminuição da idade e tamanho das primíparas, produção de ninhadas mais numerosas e neonatos com menores dimensões (De Meester & Weider 1999). *Daphnia* demonstra grande plasticidade fenotípica como resposta a fatores externos, estando relacionadas com a estratégia de menor custo energético (Burks et al. 2002), que podem ser desencadeadas por diversos fatores como presença de predadores, recursos alimentares, luz, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e xenobióticos (Dodson et al. 1995; Lass & Spaak 2003; Castro et al. 2009). O estudo desenvolvido por Castro et al. (2009), avaliou a resposta reprodutiva e morfológica de *D. longispina* na presença indireta (via infoquímicos) de dois peixes predadores, gambúzia (*Gambusia holbrooki*) e a perca-sol (*Lepomis gibbosus*), resultando em antecipação da reprodução e aumento da fecundidade independente da concentração dos infoquímicos (Castro et al. 2009). No entanto, esse comportamento não é padrão, como relatado por Hazanato et al. 2001, que observou redução da taxa de crescimento, do tempo de maturação e tamanho das crias em *Daphnia pulex* em presença de predadores (Hanazato et al. 2001).

Semelhante ao que ocorre na presença de predadores, *Daphnia* reage a presença de xenobióticos desenvolvendo defesas morfológicas, comportamentais e reprodutivas (Burks et al. 2002), com custos para o indivíduo a nível metabólico, fisiológico ou reprodutivo (Lass & Spaak 2003). Vários compostos tóxicos conseguem igualmente modular a resposta reprodutiva em diversas espécies do género *Daphnia*. A exposição de *D. longispina* ao herbicida Primextra® Gold TZ, culminou de redução de fecundidade (Neves et al. 2015). Efeitos negativos na fecundidade de *Daphnia magna* também foi observada após exposição a um metabolito da cocaína (benzoilecgonina) (Parolini et al. 2018) e ao bisfenol A (Masteling et al. 2016). Diminuição no número total de descendentes também foi observado em *D. magna* exposta a fármacos hormonais (Goto & Hiromi 2003) e anti-inflamatórios não-esteroidais (paracetamol, ibuprofeno e diclofenaco)(Du et al. 2016). Exposição de *D. longispina* ao zinco resultou na diminuição do número de neonatos para todas as concentrações testadas (Martins et al. 2017). Apesar de

vários xenobióticos modularem resposta reprodutiva no género *Daphnia*, neste trabalho a exposição ao piritionato não desencadeou tais efeitos. No entanto, alterações comportamentais e alterações a nível bioquímico foram evidenciadas, demonstrando a relevância em termos ecológicos deste estudo.

V. CONCLUSÃO

Os compostos farmacêuticos podem chegar ao ambiente aquático por diferentes vias. Essas substâncias podem exercer efeitos crónicos subtis e podem ocorrer a nível bioquímico, podendo se estender a populações e comunidades. Não desencadeando efeitos agudos letais visíveis tornam-se imperceptíveis no que se refere aos mecanismos de toxicidades. Este estudo tentou abordar os diferentes níveis suscetíveis de ocorrência de efeitos desencadeado pelo paracetamol e piritionato de zinco, através da avaliação da mortalidade, comportamento de natação e parâmetros bioquímicos a nível de *stress* oxidativo e neurotoxicidade e reprodução em duas espécies de cladóceros, *D. magna* e *D. longispina*.

Neste estudo *D. magna* demonstrou ser mais sensível do que *D. longispina* à exposição ao paracetamol. Defesas anti-oxidantes foram ativadas em *D. magna* devido a exposição ao paracetamol, nomeadamente catalase e GSTs; no entanto em *D. longispina*, os resultados não foram conclusivos, pois não houve alteração na actividade da catalase, indicando que a alteração da actividade nas GSTs pode ser devido a mecanismos de desintoxicação e metabolismo do paracetamol. Neurotoxicidade não foi observada através de alterações na actividade da acetilcolinesterase das espécies analisadas, entretanto potencial neurotóxico deste fármaco não pode ser descartado, considerando a duração da exposição (48h), que não reproduz o que acontece em termos ambientais, onde o tipo de exposição esperada é a crónica. Apesar disso, alterações comportamentais foram observadas após exposição ao paracetamol, confirmando que mesmo doses subletais podem atingir os organismos alterando suas funções.

Nossos resultados indicaram que piritionato de zinco é potencialmente mais tóxico para *D. magna* do que para *D. longispina*, e pode desencadear efeitos

oxidativos e neurotóxico. Entretanto, relação entre alterações comportamentais em *D. magna* e neurotoxicidade não são conclusivas, visto que as determinações enzimáticas foram realizadas em neonatos, e para estas espécies não foram observadas alterações significativas nessa idade, fazendo-se necessário estudos complementares para avaliar tais efeitos em adultos.

Os resultados demonstram que o piritionato de zinco e paracetamol são potenciais ameaças aos organismos aquáticos, relativamente a espécies zooplancônicas como os cladóceros. Resultados dessa natureza causam preocupações, pois ambas as exposições foram realizadas com concentrações ambientalmente relevantes e exposições agudas, desencadeando alterações a nível bioquímicos e funcionais, indicando que efeitos tóxicos importantes podem ser induzidos por esses fármacos a nível ambiental.

Devido a deficiência de dados relativamente ao piritionato de zinco, é de suma importância abranger o estudo a outros organismos, caracterizando seus efeitos e mecanismos toxicológicos.

BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, pp.121–126.
- Almeida, E., Diamantino, T. & Sousa, O. de, 2007. Breve história das tintas antivegetativas. *Corrosão e Proteção de Materiais*, 26(1), pp.6–12.
- Anastasiou, T.I. et al., 2016. Imposex and organotin compounds in ports of the Mediterranean and the Atlantic: Is the story over? *Science of The Total Environment*, 569–570, pp.1315–1329.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. & Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), pp.1319–1330.
- Ankley, G.T. et al., 2007. Repeating history: Pharmaceuticals in the environment. *Environmental Science and Technology*, 41(24), pp.8211–8217.
- Antunes, S. & Castro, B., 2017. Pulgas-de-Água (*Daphnia* spp.). *Revista de Ciência Elementar*, 5(4), pp.8–11.
- Antunes, S.C. et al., 2013. Biochemical effects of acetaminophen in aquatic species: edible clams *Venerupis decussata* and *Venerupis philippinarum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), pp.6658–6666.
- Antunes, S.C., Castro, B.B. & Gonçalves, F., 2003. Chronic responses of different clones of *Daphnia longispina* (field and ehippia) to different food levels. *Acta Oecologica*, 24(SUPPL. 1), pp.S325–S332.
- Antunes, S.C., Pereira, R. & Gonçalves, F., 2007. Evaluation of the potential toxicity (acute and chronic) of sediments from abandoned uranium mine ponds. *Journal of Soils and Sediments*, 7(6), pp.368–376.
- ANVISA, 2010. Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, 2, p.546.
- ASTM, 2007. Standard guide fo cnducting acute toxicity tests on test materials with fishes, marcroinvertebrates, and amphibians. *ASTM International*, Designatio(Reapproved), pp.1–22.

- Bajt, M.L. et al., 2006. Nuclear Translocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor during Acetaminophen-Induced Liver Cell Injury. *Toxicological Sciences*, 94(1), pp.217–225.
- Balakrishna, K. et al., 2017. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137(November 2016), pp.113–120.
- Bao, V.W.W. et al., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin*, 62(5), pp.1147–1151.
- Bao, V.W.W. et al., 2008. Synergistic toxic effects of zinc pyrithione and copper to three marine species: Implications on setting appropriate water quality criteria. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6–12), pp.616–623.
- Bao, V.W.W., Lui, G.C.S. & Leung, K.M.Y., 2014. Acute and chronic toxicities of zinc pyrithione alone and in combination with copper to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 157, pp.81–93.
- Barroso, C.M., Moreira, M.H. & Bebianno, M.J., 2002. Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series*, 230, pp.127–135.
- Barroso, C.M., Moreira, M.H. & Gibbs, P.E., 2000. Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Marine Ecology Progress Series*, 201, pp.221–232.
- Beek, T.A. Der et al., 2016. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), pp.823–835.
- Bendz, D. et al., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hölje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), pp.195–204.
- Bessemers, J.G.M. & Vermeulen, N.P.E., 2001. Paracetamol (Acetaminophen)-

- Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(1), pp.55–138.
- Biesinger, K.E. & Christensen, G.M., 1972. Effects of Various Metals on Survival, Growth, Reproduction, and Metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29(12), pp.1691–1700.
- Bila, D.M. & Dezotti, M., 2003. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, 26(4), pp.523–530.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp.248–254.
- Brandão, F.P. et al., 2011. The impact of paracetamol on selected biomarkers of the mollusc species *Corbicula fluminea*. *Environmental toxicology*.
- Burks, R.L. et al., 2002. Diel horizontal migration of zooplankton: costs and benefits of inhabiting the littoral. *Freshwater Biology*, 47, pp.343–365.
- Calamari, D. et al., 2003. Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environmental Science & Technology*, 37(7), pp.1241–1248.
- Calleja, M.C., Persoone, G. & Geladi, P., 1994. Comparative acute toxicity of the first 50 Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(1), pp.69–78.
- Caramujo, M.J. & Boavida, M.J., 2000. The crustacean communities of River Tagus reservoirs. Zooplankton structure as reservoir trophic state indicator. *Limnetica*, 18, pp.37–56.
- Carballa, M. et al., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, 38(12), pp.2918–2926.
- Carvalho, E.V. de et al., 2009. Aspectos legais e ambientais do descarte de resíduos de medicamentos. *Revista Brasileira de Toxicologia*, (1–2), pp.1–

- Castiglioni, S. et al., 2006. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science and Technology*, 40(1), pp.357–363.
- Castillo Morales, G., 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas.*,
- Castro, B.B., Consciência, S. & Gonçalves, F., 2009. Comunicação química em sistemas predador-presa alterados: um contributo para a controvérsia. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*, 1(1), pp.54–66.
- Castro, C.G.S.O. de, 2000. *Estudos de utilização de medicamentos: noções básicas* 1st ed. Fiocruz, ed., Rio de Janeiro.
- Castro, Í.B., Westphal, E. & Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, 34(6), pp.1021–1031.
- CE, 2008. Diretiva 2008/98/CE de 19 de Novembro de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*, 312, pp.3–30.
- Chevalier, J. et al., 2015. Exploration of Daphnia behavioral effect profiles induced by a broad range of toxicants with different modes of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(8), pp.1760–1769.
- Choi, E., Alsop, D. & Wilson, J.Y., 2018. The effects of chronic acetaminophen exposure on the kidney, gill and liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 198(November 2017), pp.20–29.
- Correia, B. et al., 2016. Oxidative effects of the pharmaceutical drug paracetamol on the edible clam *Ruditapes philippinarum* under different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 179, pp.116–124.
- Costa, Eula Maria De Melo Oliveira, V. De & Pimenta, F.C., 2004. Citocromos P450 e biotransformação bacteriana. *Revista de patologia tropiaca*, 33(1), pp.21–31.

- Costa, C.R. et al., 2008. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. *Quimica Nova*, 31(7), pp.1820–1830.
- Cuevas, N. et al., 2011. A visual guideline for the determination of imposex in *Nassarius reticulatus* and *Nassarius nitidus*. *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia*, 18(7), pp.134–152.
- Dahlin, D.C. et al., 1984. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(5), pp.1327–1331.
- Daughton, C.G. & Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and care products in the environment C. G. Daughton & T. L. Jones-Lepp, eds. *Environmental Health Perspectives*, 107(12), pp.907–937.
- Dave, G. & Herger, G., 2012. Determination of detoxification to *Daphnia magna* of four pharmaceuticals and seven surfactants by activated sludge. *Chemosphere*, 88(4), pp.459–466.
- Delwing-de Lima, D. et al., 2010. Guanidino compounds inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities: Effect neuroprotector of vitamins E plus C. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(6), pp.465–473.
- Dinning, A.J. et al., 1998. Pyrethroid biocides as inhibitors of bacterial ATP synthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), pp.141–146.
- Dodson, S. & Ramcharan, C., 1991. Size specific swimming behavior of *Daphnia pulex*. *Journal of Plankton Research*, 13(6), pp.1367–1379.
- Dodson, S.I., Hanazato, T. & Gorski, P.R., 1995. Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus* kairomone. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(1), pp.43–50.
- Donnachie, R.L., Johnson, A.C. & Sumpter, J.P., 2016. A rational approach to selecting and ranking some pharmaceuticals of concern for the aquatic environment and their relative importance compared with other chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), pp.1021–1027.

- Dorval, J. & Hontela, A., 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(2), pp.191–200.
- Du, J. et al., 2016. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(1), pp.84–90.
- Duquesne, S. & Küster, E., 2010. Biochemical, metabolic, and behavioural responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), pp.353–359.
- Ebert, D., 2005. Introduction to *Daphnia* Biology. In Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), ed. *Ecology, Epidemiology, and Parasitism in Daphnia*. pp. 1–25.
- Ellman, G.L. et al., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7, pp.88–95.
- Elorriaga, Y. et al., 2013. Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(4), pp.397–400.
- FDA - Center for Drug Evaluation and Research, 2017. Safe Disposal of Medicines - Eliminación de medicamentos no utilizados: qué debe saber. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/EnsuringSafeUseofMedicine/SafeDisposalofMedicines/ucm529429.htm> [Accessed February 8, 2018].
- Fent, K., Weston, A.A. & Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), pp.122–159.
- Ferrão-Filho, A.S. et al., 2014. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (cladocera).

- Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), pp.223–229.
- Forró, L. et al., 2008. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), pp.177–184.
- Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*, 294(5548), pp.1871–1875.
- Gaffney, V. de J. et al., 2014. Análise de fármacos em águas por spe-uplc-esi-MS/MS. *Química Nova*, 37(1), pp.138–149.
- Gagné, F., Blaise, C. & André, C., 2006. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(3), pp.329–336.
- Galus, M. et al., 2013. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 132–133, pp.200–211.
- Ghiselli, G., 2006. *Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)*.
- Golet, E.M. et al., 2001. Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry*, 73(15), pp.3632–3638.
- Gómez, M.J. et al., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66(6), pp.993–1002.
- Gonçalves, A.M.M. et al., 2007. Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*). *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 43(1), pp.13–20.
- Gonzalez-Rey, M. et al., 2015. Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Marine Pollution Bulletin*, 96(1–2), pp.384–400.

- Goto, T. & Hiromi, J., 2003. Toxicity of 17 α -ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna* , with special reference to their synergetic effect. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1–6), pp.139–142.
- Gracia-Lor, E. et al., 2012. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*, 87(5), pp.453–462.
- Gracianni, F.S. & Ferreira, G.L.B. V., 2014. Descarte de medicamentos: Panorama da logística reversa no Brasil. *Revista Espacios*, 35(5), p.11.
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S. & Barceló, D., 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem. *Journal of Chromatography A*, 1248, pp.104–121.
- Guilhermino, L. et al., 1996. Acetylcholinesterase Activity in Juveniles of *Daphnia magna* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(6), pp.979–985.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases - The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), pp.7130–7140.
- Hamza, W. & Ruggiu, D., 2000. Swimming Behaviour of *Daphnia galeata x hyalina* as a Response to Algal Substances and to Opaque Colours. *International Review of Hydrobiology*, 85(2–3), pp.157–166.
- Hanazato, T., Fueki, K. & Yoshimoto, M., 2001. Fish-induced life-history shifts in the cladocerans *Daphnia* and *Simocephalus*: are they positive or negative responses? *Journal of Plankton Research*, 23(9), pp.945–951.
- Hayashi, Y. et al., 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology*, 17(4), pp.246–251.
- Henschel, K.P. et al., 1997. Environmental hazard assessment of

- pharmaceuticals. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 25(3), pp.220–5.
- Hinson, J.A. & Al, J.E.T., 2003. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(12), pp.1499–1506.
- Hirsch, R. et al., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 225(1–2), pp.109–118.
- Jasinska, E.J. et al., 2015. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Science of The Total Environment*, 530–531, pp.140–153.
- Jung, S.M. et al., 2017. Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), pp.811–818.
- Kavitha, P. et al., 2011. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 47(10), pp.698–706.
- Kim, P. et al., 2012. Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere*, 89(1), pp.10–18.
- Kim, Y. et al., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33(3), pp.370–375.
- Kolpin, D.W. et al., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6), pp.1202–1211.
- Konstantinou, I.K. & Albanis, T.A., 2004. Worldwide occurrence and effects of

- antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*, 30(2), pp.235–248.
- Koutsaftis, A. & Aoyama, I., 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of The Total Environment*, 387(1–3), pp.166–174.
- Laitano, K.S. & Matias, W.G., 2006. Testes de Toxicidade com *Daphnia magna* Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1(1), pp.43–47.
- Laranjeiro, F. et al., 2015. Tributyltin pollution biomonitoring under the Water Framework Directive: Proposal of a multi-species tool to assess the ecological quality status of EU water bodies. *Ecological Indicators*, 57, pp.525–535.
- Larson, A.M. et al., 2005. Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, 42(6), pp.1364–1372.
- Lass, S. & Spaak, P., 2003. Chemically induced anti-predator defences in plankton: A review. *Hydrobiologia*, 491, pp.221–239.
- Leaver, M.J. & George, S.G., 1998. A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Marine Environmental Research*, 46(1–5), pp.71–74.
- Li, M., 2013. Acute toxicity of 30 pharmaceutically active compounds to freshwater planarians, *Dugesia japonica*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(7), pp.1157–1170.
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T. & Kronberg, L., 2005. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*, 39(11), pp.2219–2228.
- Loureiro, C. et al., 2011. Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: chelators and ionic composition versus metal toxicity. *Ecotoxicology*, 20(1), pp.139–148.

- Mackie, D.S., Van Den Berg, C.M.G. & Readman, J.W., 2004. Determination of pyrithione in natural waters by cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 511(1), pp.47–53.
- Madsen, T. et al., 2000. Ecotoxicological Assessment of Antifouling Biocides and Nonbiocidal Antifouling Paints. *Danish Environmental Protection Agency*, (531).
- Magalhães, D.D.P. & Ferrão, S., 2008. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Australis*, 12(3), pp.355–381.
- Maraldo, K. & Dahllöf, I., 2004. Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9–10), pp.894–901.
- Marcheselli, M., Rustichelli, C. & Mauri, M., 2010. Novel antifouling agent zinc pyrithione: determination, acute toxicity, and bioaccumulation in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(11), pp.2583–2592.
- Marin-Morales, M.A. et al., 2016. Eco-toxicological Impact of Pharmaceuticals for Human Use in Aquatic Systems. *OMICS Ebooks*, (May), pp.1–20.
- Martins, C., Jesus, F.T. & Nogueira, A.J.A., 2017. The effects of Copper and Zinc on survival, growth and reproduction of the cladoceran *Daphnia longispina*: introducing new data in an “old” issue. *Ecotoxicology*, 26(9), pp.1157–1169.
- Martins, T.L. & Vargas, V.M.F., 2013. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 8(1), pp.1–11.
- Masteling, R.P. et al., 2016. Whole-organism and biomarker endpoints in *Daphnia magna* show uncoupling of oxidative stress and endocrine disruption in phenolic derivatives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, pp.64–71.
- McGill, M., Curry, S.C. & Jaeschke, H., 2012. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves

- mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), pp.1574–1583.
- De Meester, L. & Weider, L.J., 1999. Depth selection behavior, fish kairomones, and the life histories of *Daphnia hyalina* X *galeata* hybrid clones. *Limnology and Oceanography*, 44(5), pp.1248–1258.
- Melo, D.O. de, Ribeiro, E. & Storpirtis, S., 2006. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(4), pp.475–485.
- Melo, S.A.S. et al., 2009. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, 32(1), pp.188–197.
- Mezzelani, M. et al., 2016. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 121, pp.31–39.
- Miranda, S.I.M., 2014. *Remoção de Fármacos de Águas Contaminadas . Avaliação de vários Substratos*. Universidade de Évora.
- Mochida, K. et al., 2006. Acute toxicity of pyrrithione antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and tou shrimp (*Heptacarpus futilirostris*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(11), pp.3058–3064.
- Mochida, K. et al., 2009. Inhibition of acetylcholinesterase by metabolites of copper pyrrithione (CuPT) and its possible involvement in vertebral deformity of a CuPT-exposed marine teleostean fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(4), pp.624–630.
- Nascimento, M.C. do, 2005. Medicamentos, comunicação e cultura. *Ciência & Saúde Coletiva*, 10(suppl), pp.179–193.
- Neves, M. et al., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina* , to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S -metolachlor).

- Ecological Indicators*, 53, pp.220–230.
- Nunes, B., 2011. A presença de fármacos no ambiente. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 1(1), pp.43–54.
- Nunes, B. et al., 2014. Biochemical and standard toxic effects of acetaminophen on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), pp.10815–10822.
- Nunes, B., Barbosa, A.R., et al., 2014. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9), pp.6258–6262.
- Nunes, B. et al., 2015. Ecotoxicological effect of zinc pyrithione in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology*, 24(9), pp.1896–1905.
- Nunes, B., 2010. Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*, 2(1), pp.9–20.
- Nunes, B., Antunes, S.C., et al., 2014. Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, pp.178–185.
- Nunes, B. et al., 2017. Toxicological effects of paracetamol on the clam *Ruditapes philippinarum*: exposure vs recovery. *Aquatic Toxicology*, 192(July), pp.198–206.
- Nunes, B., Carvalho, F. & Guilhermino, L., 2005. Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(4), pp.369–376.
- Nunes, B., Carvalho, F. & Guilhermino, L., 2006. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62(4), pp.581–594.
- Nunes, B., Verde, M.F. & Soares, A.M.V.M., 2015. Biochemical effects of the

- pharmaceutical drug paracetamol on *Anguilla anguilla*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), pp.11574–11584.
- OECD, 2004. Guidelines 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test and reproduction test. , (April), pp.1–12.
- OECD, 2012. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. , (October).
- Ohji, M. & Harino, H., 2017. Comparison of Toxicities of Metal Pyrithiones Including Their Degradation Compounds and Organotin Antifouling Biocides to the Japanese Killifish *Oryzias latipes*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(2), pp.285–293.
- Oliveira, L.L.D. et al., 2015. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, pp.123–131.
- Oruc, O.E., Sevgiler, Y. & Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 137(1), pp.43–51.
- Oyama, T.M. et al., 2012. Nanomolar concentrations of zinc pyrithione increase cell susceptibility to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes. *Chemosphere*, 87(11), pp.1316–1322.
- Parolini, M. et al., 2018. Benzoylcegonine exposure induced oxidative stress and altered swimming behavior and reproduction in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 232, pp.236–244.
- Parolini, M. et al., 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cytogenotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 79(5), pp.489–498.
- Pechenik, J.A., 2016. Biologia dos Invertebrados 7ed. In ARTMED EDITORA S.A., ed. *Biologia dos Invertebrados*. pp. 379–380.
- Persoone, G. et al., 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test –

- Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (393), p.01.
- Pugajeva, I. et al., 2017. Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 133, pp.64–74.
- Qi, S. et al., 2017. An electrochemical immunosensor based on pristine graphene for rapid determination of ractopamine. *Chemical Physics Letters*, 685, pp.146–150.
- Rabiet, M. et al., 2006. Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment. *Environmental Science & Technology*, 40(17), pp.5282–5288.
- Ramos, A.S. et al., 2014. Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: Detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(3), pp.1221–1228.
- Rehman, M.S.U. et al., 2015. Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries. *Chemosphere*, 138, pp.1045–1055.
- Restani, G. & Fonseca, A., 2014. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains (Woloszynska, 1912) Senayya & Subba Raju on the mobility of *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphniidae). *Brazilian Journal of Biology*, 74(1), pp.23–31.
- Ringelberg, J. & Van Gool, E., 2003. On the combined analysis of proximate and ultimate aspects in diel vertical migration (DVM) research. *Hydrobiologia*, 491(1–3), pp.85–90.
- Roberts, P. & Thomas, K., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment*, 356(1–3), pp.143–153.

- Rowley, A.F., 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *Journal of Experimental Biology*, 208(1), pp.3–14.
- Sacher, F. et al., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, 938(1–2), pp.199–210.
- Sakkas, V.A. et al., 2007. Aqueous phototransformation of zinc pyrithione. *Journal of Chromatography A*, 1144(2), pp.175–182.
- Salibián, A., 2013. Los fármacos como contaminantes emergentes de los ambientes acuáticos. *Revista Farmaceutica*, 156(1–2), pp.76–92.
- Sánchez-Bayo, F. & Goka, K., 2006. Influence of light in acute toxicity bioassays of imidacloprid and zinc pyrithione to zooplankton crustaceans. *Aquatic Toxicology*, 78(3), pp.262–271.
- Santos, J.L. et al., 2005. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta*, 550(1–2), pp.116–122.
- Santos, L.H.M.L.M. et al., 2013. Development of a simple analytical method for the simultaneous determination of paracetamol, paracetamol-glucuronide and p-aminophenol in river water. *Journal of Chromatography B*, 930, pp.75–81.
- Santos, L.H.M.L.M. et al., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), pp.45–95.
- Schwartz, J.R. et al., 2011. New insights on dandruff/seborrheic dermatitis: the role of the scalp follicular infundibulum in effective treatment strategies. *British Journal of Dermatology*, 165(SUPPL. 2), pp.18–23.
- Selderslaghs, I.W.T. et al., 2013. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicology and Teratology*, 37, pp.44–56.

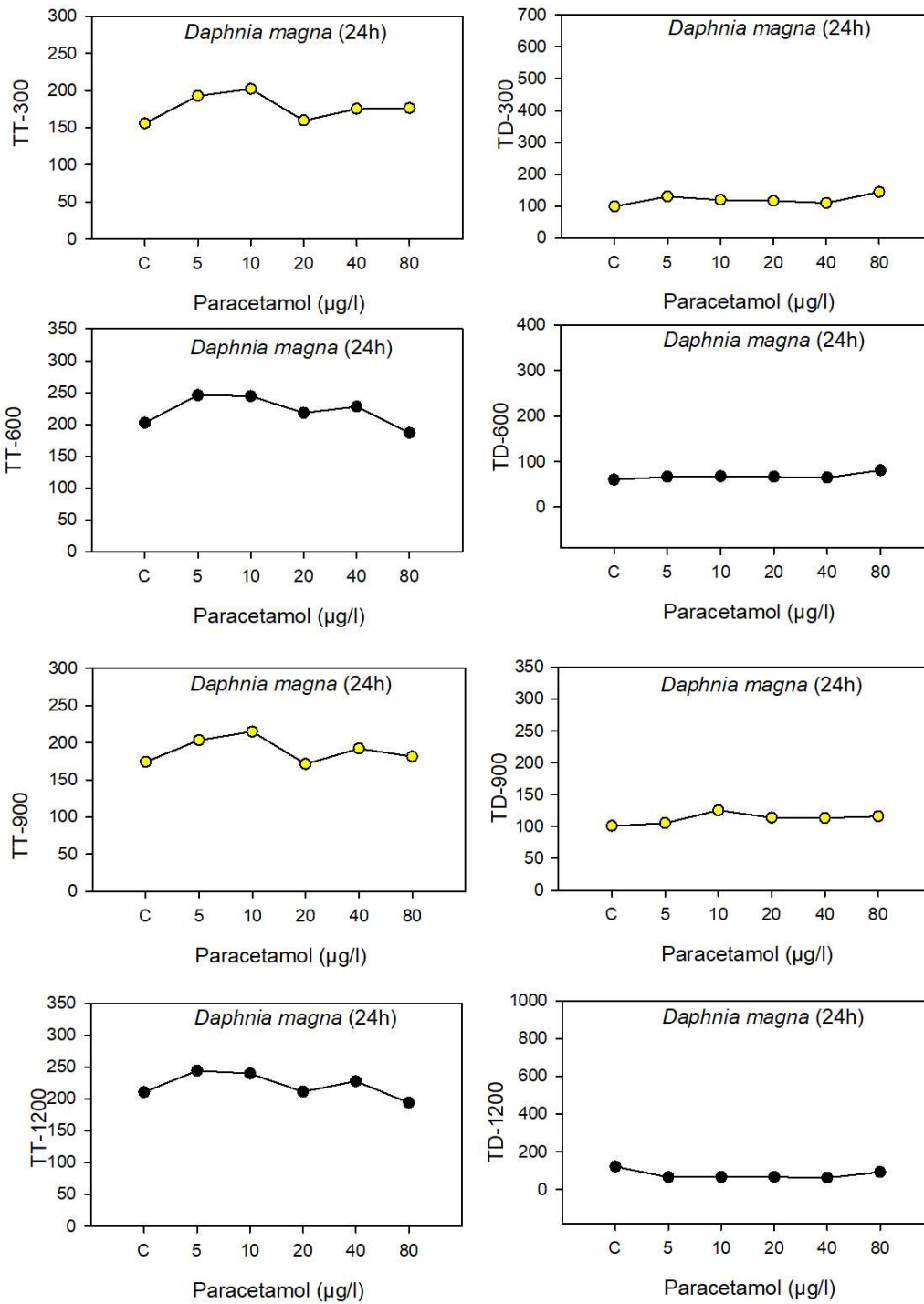
- Sismeiro-Vivas, J. et al., 2009. Short-term effects of Quirlan® (Chlorfenvinphos) on the behavior and acetylcholinesterase activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental toxicology*, 24(3), pp.296–303.
- Snyder, M., 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*, 48(4), pp.529–547.
- Solé, M. et al., 2010. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), pp.649–656.
- Soroldoni, S. et al., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *Journal of Hazardous Materials*, 330, pp.76–82.
- Sousa, I.E.S., 2015. *Métodos de eliminação de fármacos e seus metabolitos ao nível das Estações de Tratamento de Águas Residuais*. Universidade Fernando Pessoa.
- Stackelberg, P.E. et al., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of The Total Environment*, 329(1–3), pp.99–113.
- Stein, J.R., 1973. *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*, New York: Cambridge University Press.
- Stumpf, M. et al., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of The Total Environment*, 225(1–2), pp.135–141.
- Ternes, T.. et al., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of The Total Environment*, 225(1–2), pp.81–90.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers1Dedicated to Professor Dr. Klaus Haberer on the occasion of his 70th birthday.1. *Water Research*, 32(11), pp.3245–3260.

- Thomas, K. V. et al., 2001. Antifouling Paint Booster Biocides in the UK Coastal Environment and Potential Risks of Biological Effects. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), pp.677–688.
- Thomas, K. V. & Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*, 26(1), pp.73–88.
- Togola, A. & Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1177(1), pp.150–158.
- Turley, P.A., Fenn, R.J. & Ritter, J.C., 2009. Pyrithiones as antifoulants : Environmental chemistry and preliminary risk assessment. , 7014.
- USEPA, 1993. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*,
- Verlicchi, P., Aukidy, M. & Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment*, 429, pp.123–155.
- Vlahogianni, T. et al., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54(9), pp.1361–1371.
- Voogt, P. et al., 2009. Development of a common priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle. *Water Science & Technology*, 59(1), p.39.
- Webb, S.F., 2001. A Data-based Perspective on the Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals I — Collation of Available Ecotoxicity Data. In *Pharmaceuticals in the Environment*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 175–201.
- Weiner, L. et al., 1994. Oxidative stress transforms acetylcholinesterase to a molten-globule-like state. *Biochemical and biophysical research communications*, 198(3), pp.915–22.

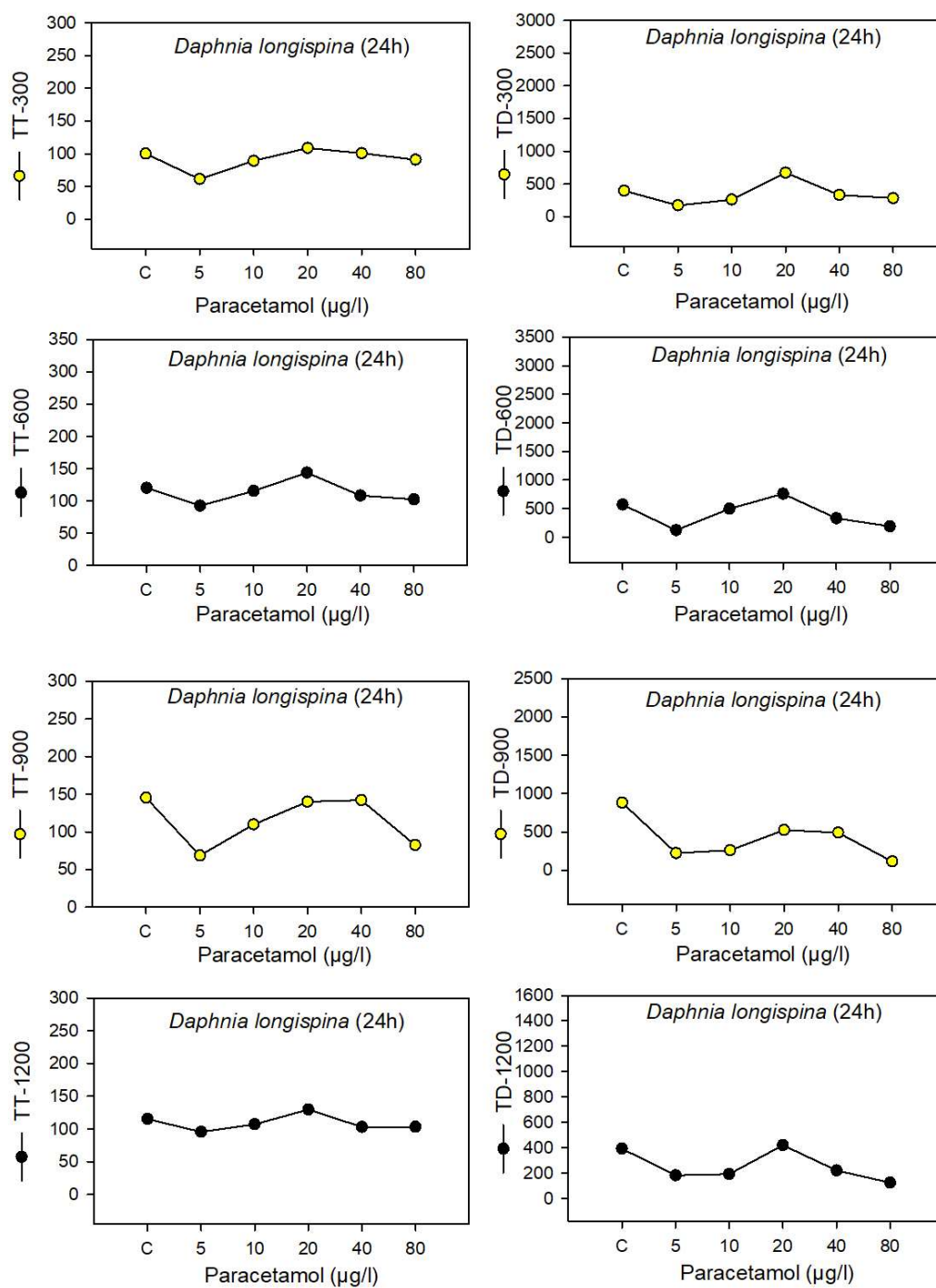
- Winston, G.W. & Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19(2), pp.137–161.
- Wolf, G., Scheunders, P. & Selens, M., 1998. Evaluation of the swimming activity of *Daphnia magna* by image analysis after administration of sublethal Cadmium concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), pp.99–105.
- Xia, L., Zheng, L. & Zhou, J.L., 2017. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 182, pp.416–425.
- Xuereb, B. et al., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94(2), pp.114–122.
- Ziarek, J.J. et al., 2011. Seasonal adaptations of *Daphnia pulex* swimming behaviour: the effect of water temperature. *Hydrobiologia*, 661(1), pp.317–327.
- Zou, J. et al., 1999. Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *Biochemical Journal*, 340(1), p.153.

ANEXOS

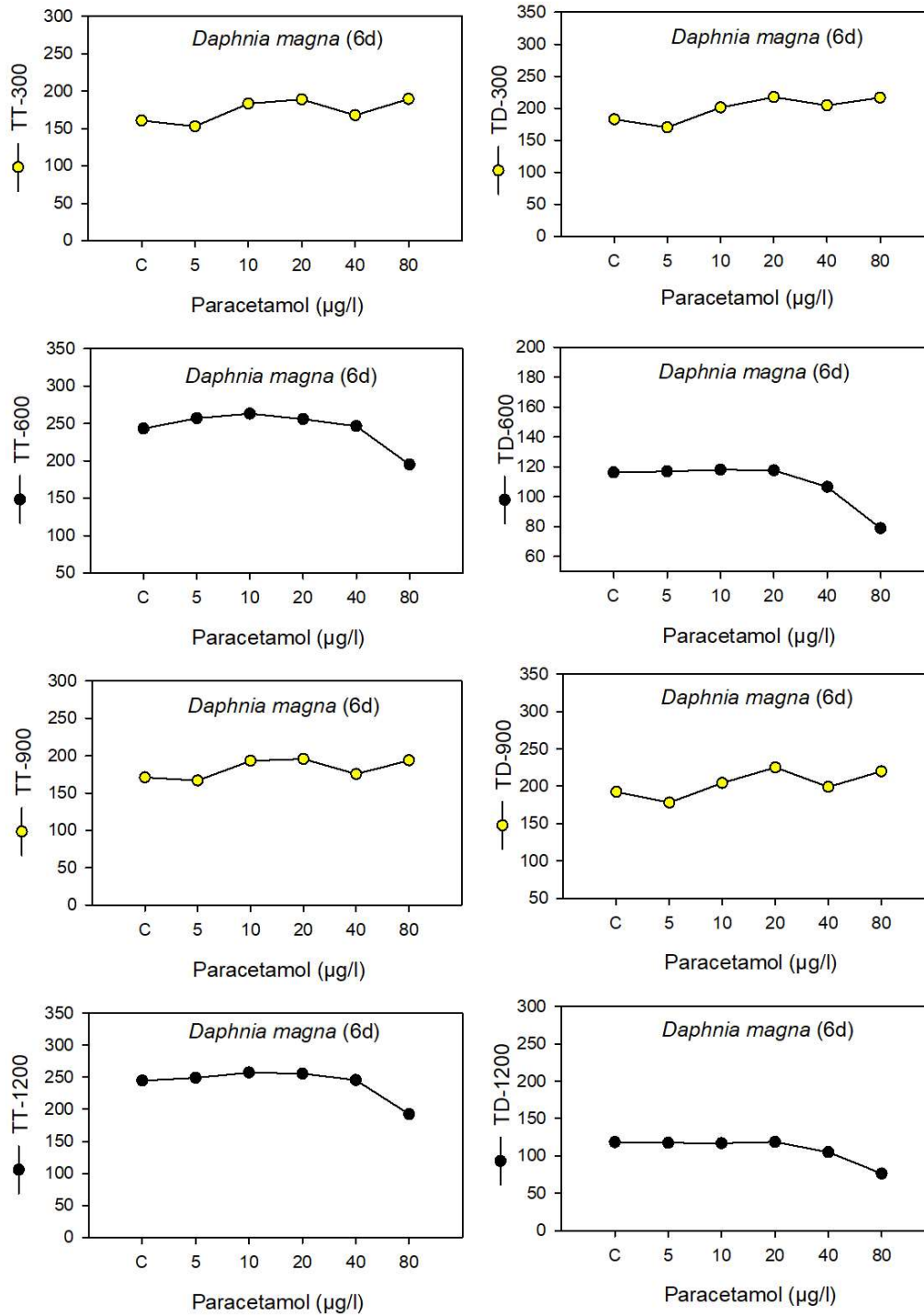
I. Comportamento de natação após exposição ao paracetamol - *Daphnia magna* (24h)



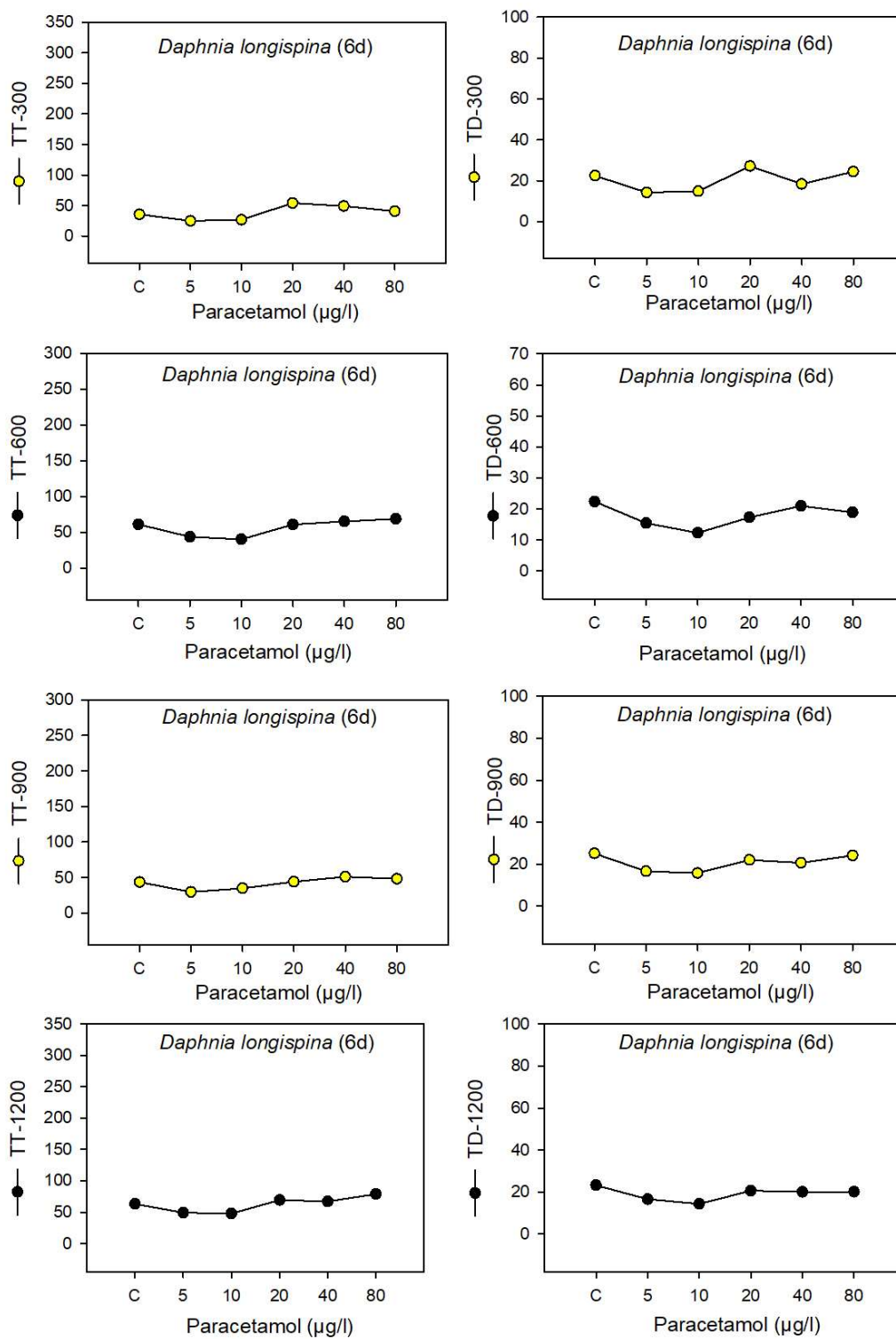
II. Comportamento de natação após exposição ao paracetamol –*Daphnia longispina* (24h)



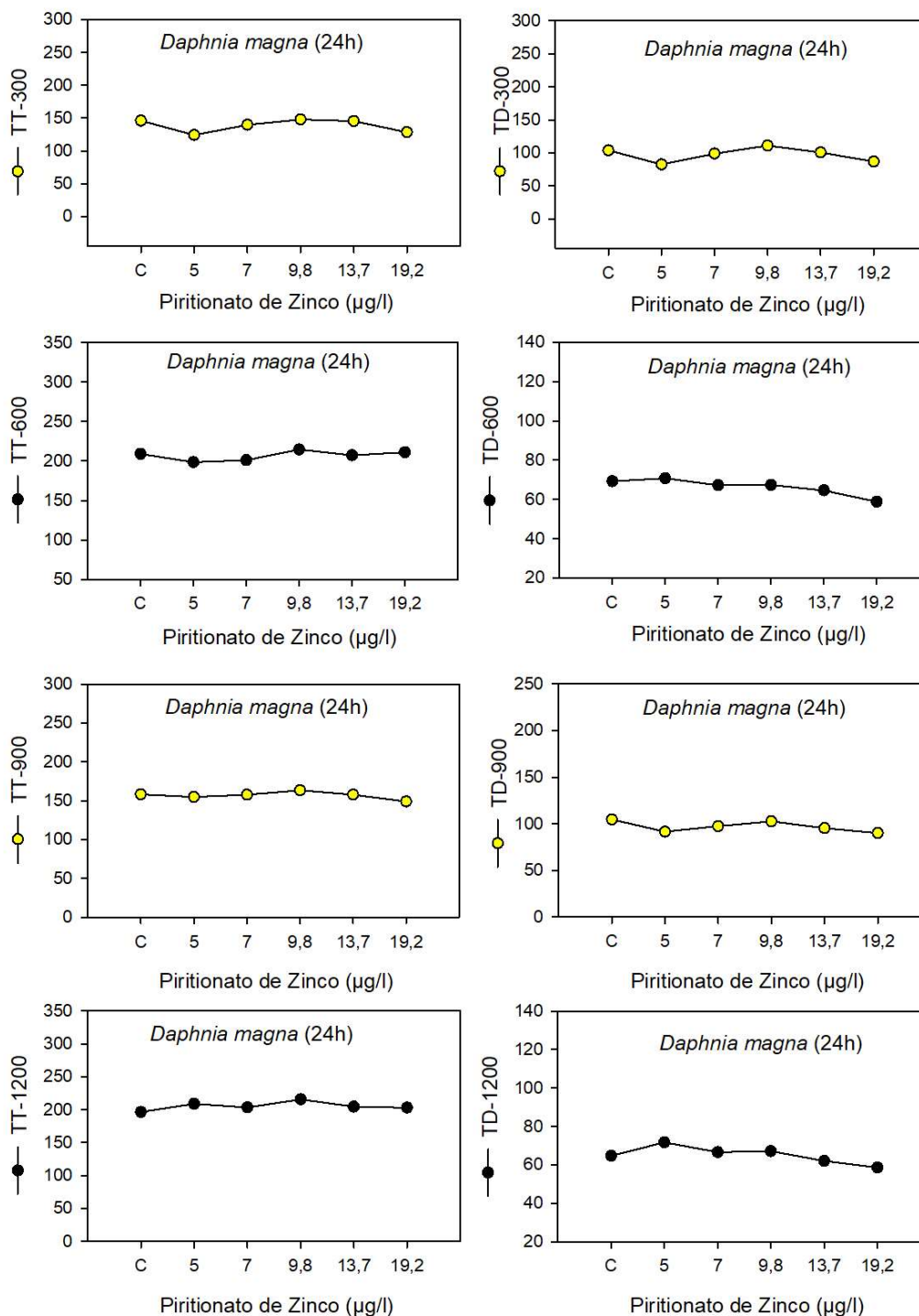
III. Comportamento de natação após exposição ao paracetamol - *Daphnia magna* (6dias)



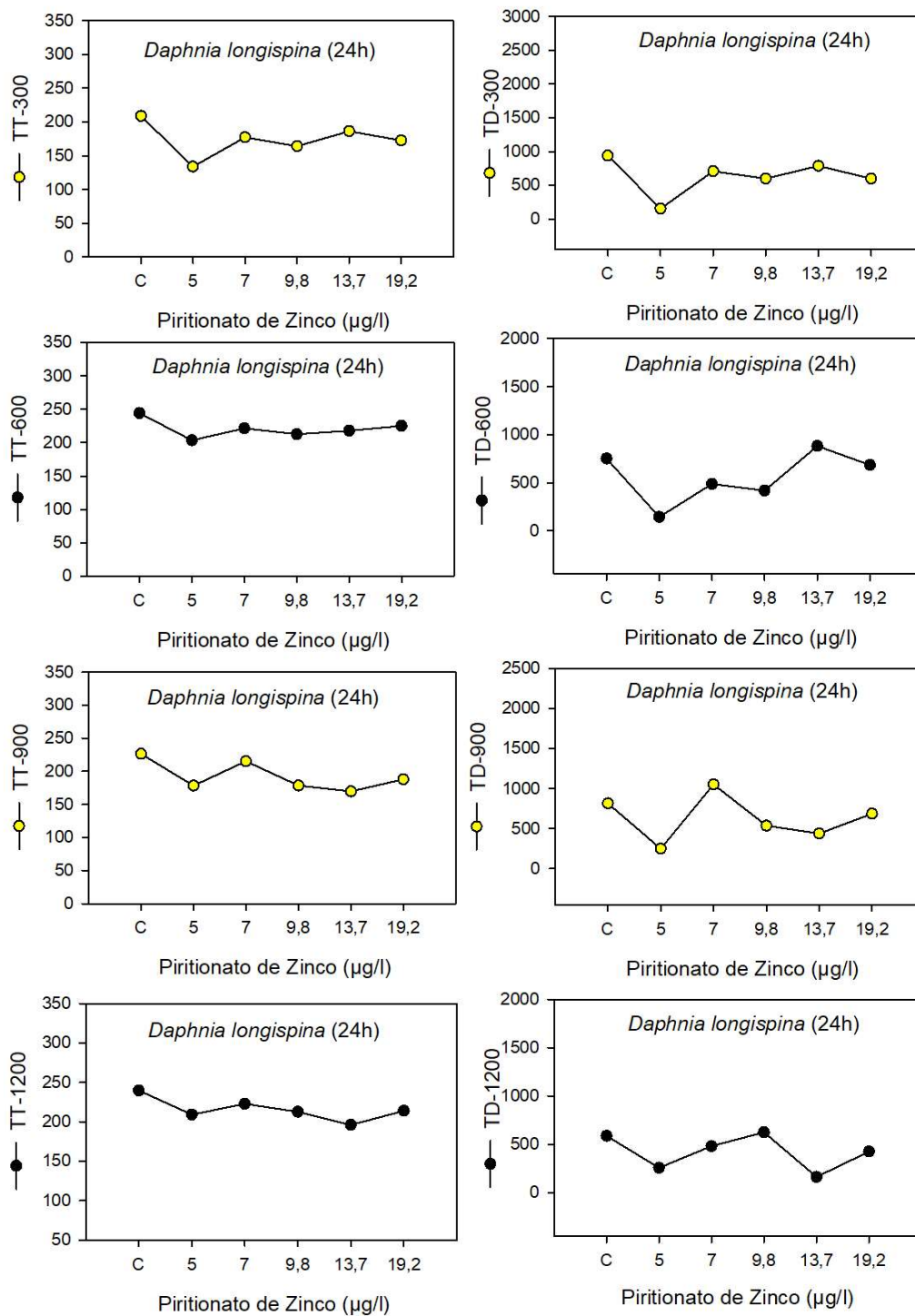
IV. Comportamento de natação após exposição ao paracetamol - *Daphnia longispina* (6 dias)



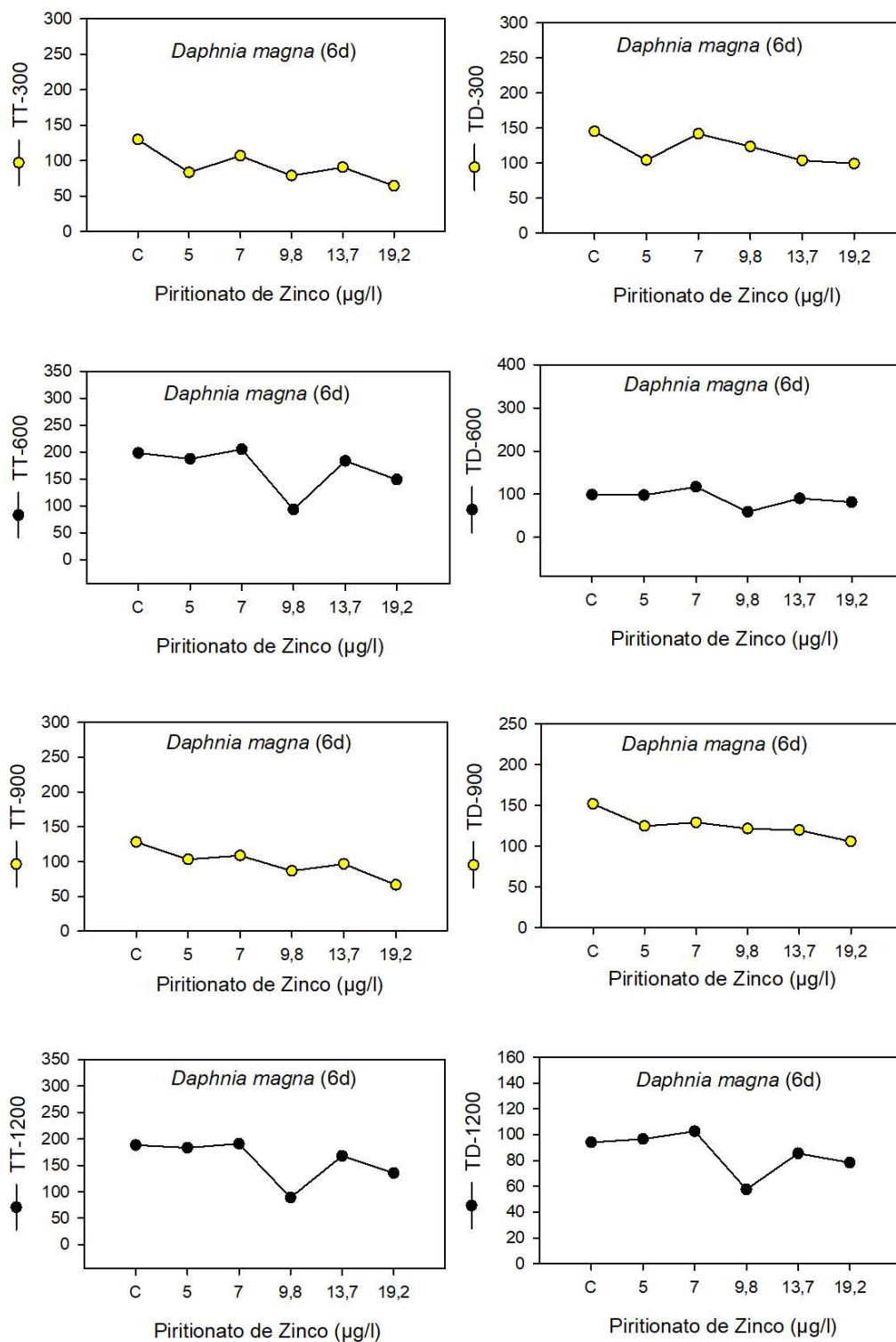
V. Comportamento de natação após exposição ao piritionato de zinco - *Daphnia magna* (24h)



VI. Comportamento de natação após exposição ao piritionato de zinco - *Daphnia longispina* (24h)



VII. Comportamento de natação após exposição ao piritionato de zinco - *Daphnia magna* (6 dias)



VIII. Comportamento de natação após exposição ao piritionato de zinco **- *Daphnia longispina* (6 dias)**

